

18.000

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas



**CARACTERIZACION FENOTIPICA DEL  
ESTROMA TIMICO DE RATA IN VITRO.  
EFECTOS DE LA DESOXIGUANOSINA Y  
DEL TRASPLANTE IN VIVO A TRAVES  
DE BARRERAS HISTOINCOMPATIBLES.**

Memoria presentada por  
ALFONSO MARTIN-FONTECHA GARCIA-MORATO  
para optar al grado de Doctor.

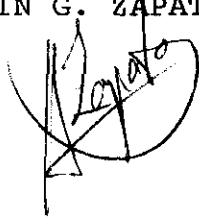
Madrid, 1992.

D. AGUSTIN G. ZAPATA GONZALEZ, Catedrático del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid y D. CARLOS FERNANDEZ-ARDAVIN CASTRO, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN: Que D. ALFONSO MARTIN-FONTECHA GARCIA-MORATO, Licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo nuestra dirección y en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, el trabajo titulado: "Caracterización del estroma tímico de rata in vitro. Efectos de la desoxiguanosina y del trasplante in vivo a través de barreras histoincompatibles", considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor.

Madrid, 15 de Septiembre de 1992

Vº Bº de los Directores  
AGUSTIN G. ZAPATA



CARLOS FDEZ.-ARDAVIN

CF Ardavin

El interesado  
ALFONSO MARTIN-FONTECHA  
GARCIA-MORATO



A mi familia..., sólo.

## **AGRADECIMIENTOS**



No por mucho repetirse en la primera página de todas las tesis dejará de ser evidente que éstas, con excepciones, no se pueden hacer en solitario. Por eso lo primero es agradecer a unas cuantas personas que han colaborado con este trabajo su ayuda. Excepto las dos primeras el orden del resto no importa.

A Agustín Zapata y Carlos Ardavín por su codirección de la Tesis, cada uno con sus puntos de vista y su manera de trabajar. Además, a Agustín por solucionarme algunas "papeletas" que me permitieron terminar sin sobresaltos y a Carlos por enseñarme todas las técnicas de cultivo.

A Henk Jan Schuurman, un auténtico "salvaje" del trabajo aunque lo más opuesto a un tradicional calvinista, por su dedicación exclusiva, agoviante, estresante, pero en definitiva fructífera y por "obligarme" a relacionarme con la "fauna" holandesa. La segunda cosa más importante para un holandés, después de "su" Reina, son las vacaciones, así que tampoco olvido que Henk Jan perdió una semana de las suyas para terminar nuestros resultados.

A Roel Broekhuizen, un buenazo, por su desmesurada y eficaz ayuda en el trabajo del Hospital de Utrecht, aunque nunca se dejó invitar a comer.

A Cees de Heer por los trámites científicos e interminables trabas burocráticas para realizar los trasplantes en el R.I.V.M. de Bilthoven.

A Martine Papiernik por darnos pie a discutir ampliamente sus resultados sobre las PTR y por dedicarme unos días en el Hospital Necker de París.

A Javier (y Ma Jesús), Alberto Varas, Nines, Constantino, Chusa, Raquel y Ana me parecería mezquino agradecerles solamente este o aquel cultivo, foto, figura, esquema, corrección, fotocopia, etc. Así que espero que me recuerden antes de entrar en el cuarto "13" y comparen. Buena parte es culpa suya. Especialmente, además, a Alberto Alvarez, mejor preparado que uno para esto de la Inmunología, esperando que el año que viene podamos compartir el "grado".

A los "niños" del "27", Esther, Gemma, Isabel, Luis, Manolo y Puri y al "club" de los holandeses, ¿con quién nos meteríamos en las comidas si no?

A Alfonso Cortés por las dichas fotos de última hora, pese a que equivocó su "dream team" blanco.

A Agustín Fernández, Pedro y Carlos Barba del Centro de Microscopía Electrónica de la U.C.M. por su ayuda, sin horarios, con el microscopio electrónico y el laboratorio de fotografía.

A Tito Silva por medir los niveles de IL-2 en los sobrenadantes Con A-SCM y por los numerosos hibridomas contra rata que nos ha proporcionado.

A Antonio de la Hera que ha permitido que la Tesis no sea un punto y aparte y que pueda seguir en esto, trabajando y haciendo la "mili" con linfocitos en lugar de uniforme y fusil.

Estando a 14°C bajo cero en invierno, en bicicleta, y en Holanda la estancia hubiese sido muy desagradable de no ser por la gente del Hospital de Utrecht, especialmente Isabel (todavía desconozco por qué le caí tan bien) y Simon con quien tuve oportunidad de ver y hablar mucho de buen fútbol.

Por último, al resto del Departamento de Biología Celular, científico y de Secretaría,

GRACIAS.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac:	Anticuerpo
AEC:	3-amino-9-etilcarbazol
APH:	fosfatasa ácida
BrdU:	bromodesoxiuridina
Con A:	concanavalina A
Con A-SCM:	medio condicionado de esplenocitos activados con Con A
CsA:	ciclosporina A
CML:	citólisis mediada por linfocitos
DAB:	3,3'-diaminobencidina
DC:	célula dendrítica
dGuo:	2'-desoxiguanosina
DTH:	hipersensibilidad de tipo retardado
FCS:	suero de ternera fetal
GVHD:	enfermedad injerto contra huésped
GM-CSF:	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
ICAM:	molécula de adhesión intercelular
IDC:	célula interdigitante
IFN:	interferon
Ig:	inmunoglobulina
IL:	interleucina
IL-2R:	receptor de interleucina 2
LFA:	antígeno asociado a la función de los linfocitos
MHC:	complejo principal de histocompatibilidad
MLR:	cultivo mixto de linfocitos
NSE:	esterasa no específica
PALS:	vaina linfoide periarteriolar
PBS:	tampón fosfato salino
PBL:	linfocitos de sangre periférica
PLPG:	paraformaldehído-glutaraldehído-periodato de lisina
PTR:	célula fagocítica del retículo tímico
REL:	retículo endoplásmico liso

RER:           retículo endoplásmico rugoso  
rIL-2:         interleucina 2 recombinante  
TBO:           bis(tri-n-butiltín)óxido  
TcR:           receptor de la célula T  
TNF:           factor de necrosis tumoral

## **INDICE**

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
PROPOSITO.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	19
FRAGMENTOS CULTIVADOS ADHERIDOS AL SOPORTE DE CULTIVO	
I. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	20
II. CULTIVOS PRIMARIOS.....	20
III. CARACTERIZACION DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS.....	20
IIIa. Caracterización fenotípica de los marcadores de superficie y citoplásmicos.....	20
IIIb. Determinación de la proliferación celular.....	21
IIIc. Preparación de los cultivos para microscopía óptica y electrónica.....	21
IIId. Histoquímica.....	22
IIIe. Ensayos de fagocitosis.....	22
IIIIf. Contajes de células positivas presentes en los cultivos primarios para los diferentes marcadores.....	22
IV. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION <u>IN VITRO</u> DE MACROFAGOS Y CELULAS DENDRITICAS DE TIMO DE RATA.....	23
IVa. Tratamiento de las células dendríticas aisladas y macrófagos cultivados con medio condicionado de esplenocitos activados con concanavalina A (Con A-SCM) e interleuquina 2 recombinante (rIL-2).....	24
IVa.1 Preparación del medio Con A-SCM.....	24
IVb. Caracterización fenotípica de los marcadores de superficie y citoplásmicos y actividades enzimáticas de macrófagos y células dendríticas aisladas.....	24
IVc. Contajes de células positivas en los aislamientos de macrófagos y células dendríticas.....	24

V.	CULTIVOS DE ESTROMA TIMICO TRATADOS CON 2'-DESOXIGUANOSINA.....	25
VI.	TRASPLANTE DE LOS FRAGMENTOS TIMICOS CULTIVADOS ADHERIDOS AL SOPORTE DE CULTIVO.....	25
FRAGMENTOS CULTIVADOS EN SUSPENSION		
VII.	PREPARACION DE LOS FRAGMENTOS CULTIVADOS EN SUSPENSION.....	26
VIII.	TRASPLANTE DE LOS FRAGMENTOS TIMICOS CULTIVADOS EN SUSPENSION.....	27
IX.	PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA HISTOLOGIA.....	27
X.	PERPARACION DE LAS MUESTRAS PARA INMUNOHISTOQUIMICA.....	28
XI.	PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA.....	28
XII.	APENDICE 1: COMPOSICION DE LOS REACTIVOS.....	29
RESULTADOS.....		32
I.	CARACTERIZACION DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE ESTROMA TIMICO DE RATA.....	33
Ia.	Establecimiento de los cultivos.....	33
Ib.	Tipos celulares presentes en los cultivos primarios.....	34
	Ib.1 Fibroblastos.....	34
	Ib.2 Células epiteliales.....	35
	Ib.3 PTR.....	36
	Ib.4 Macrófagos tipo 1.....	38
	Ib.5 Macrófagos tipo 2.....	38
	Ib.6 Células dendríticas.....	39
Ic.	Ultraestructura de los tipos celulares.....	39
Id.	Evolución temporal de los cultivos.....	40
II.	CARACTERIZACION "IN VITRO" DE MACROFAGOS Y CELULAS DENDRITICAS TIMICAS .....	42
IIa.	Macrófagos.....	42
IIb.	Células dendríticas.....	43

III.	CARACTERIZACION DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE ESTROMA TIMICO TRATADOS CON DESOXIGUANOSINA (dGuo).....	43
IV.	MORFOLOGIA DE LOS FRAGMENTOS CULTIVADOS.....	44
IVa.	Morfología de los fragmentos control y tratados con 1,35mM de dGuo, cultivados durante 5 días adheridos al frasco de cultivo.....	45
IVb.	Morfología de los fragmentos control y tratados con dGuo, ciclosporina A (CsA) o bis(tri-n-butiltín)óxido (TBTO) cultivados en suspensión.....	47
V.	CARACTERISTICAS DE LOS FRAGMENTOS, CULTIVADOS DURANTE 5 DIAS ADHERIDOS AL SOPORTE DE CULTIVO, TRASPLANTADOS EN RATAS EUTIMICAS ALOGENICAS.....	48
Va.	Fragmentos de timo cultivados y no cultivados de ratón trasplantados en rata.....	49
	Va.1 Trasplantes de fragmentos no cultivados....	49
	Va.2 Trasplantes de fragmentos cultivados.....	49
Vb.	Fragmentos de timo cultivados y no cultivados de rata trasplantados en rata.....	49
	Vb.1 Trasplantes de fragmentos no cultivados....	49
	Vb.2 Trasplantes de fragmentos cultivados.....	50
	Vb.2.1 Dos y cinco días después del trasplante.....	50
	Vb.2.2 Tres, cuatro y seis semanas después del trasplante.....	53
VI.	CARACTERISTICAS DE LOS FRAGMENTOS CULTIVADOS DURANTE 8 DIAS EN SUSPENSION, TRASPLANTADOS EN RATAS "NUDE" Y EUTIMICAS EN COMBINACIONES SINGENICA Y ALOGENICA.....	55
VIa.	Ratas "nude".....	55
VIb.	Histología del bazo y ganglios linfáticos de las ratas "nude" trasplantadas.....	58
VIc.	Ratas eutímicas.....	58
	VIc.1 Combinación singénica.....	58



Vic.2 Combinación alogénica.....	59
DISCUSION.....	61
CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFIA.....	104
TABLAS Y FIGURAS.....	134

## **INTRODUCCION**

La generación de las células T inmunocompetentes requiere la presencia de un microambiente tímico intacto que genera una serie de señales, incluyendo distintas citocinas (CARDING y col., 1991) y en la que intervienen moléculas de adhesión (LEPESANT y col., 1990; SINGER, 1990), necesarias para la correcta maduración y diferenciación de los precursores T. Además, durante la diferenciación intratímica, los timocitos son seleccionados de manera que aquellos que reconocen las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) propias maduran a células T que abandonan el timo para colonizar los órganos linfoides secundarios, mientras que aquellos que reaccionan con excesiva avidez por dichas moléculas son seleccionados negativamente muriendo en el timo o adquiriendo una condición anérgica.

Aunque la contribución concreta de cada tipo celular del estroma tímico a estos procesos no se conoce con exactitud, los datos obtenidos desde diferentes aproximaciones experimentales permiten asegurar que estas células son básicas en la generación de las células T tanto para su maduración como para su educación y diferenciación. Así, se ha descrito que cuando falta un microambiente tímico intacto no es posible el crecimiento y la diferenciación T *in vitro* (KINGSTON y col., 1985; JENKINSON y OWEN, 1990). Además, el tratamiento con drogas o radiaciones ionizantes que afectan el estroma tímico (VAN VLIET y col., 1986; HUISKAMP y col., 1988) o con anticuerpos dirigidos contra células del mismo (KRUISBEEK y col., 1983) alteran profundamente la producción de células T maduras. En animales "nude", por último, en los que el timo se reduce a restos epiteliales poco diferenciados, no se producen células T  $\alpha\beta^+$  funcionales (JENKINSON y col., 1981). Incluso datos recientes sugieren que las interacciones entre células linfoides y estroma tímico no son unidireccionales y aparentemente el desarrollo normal del epitelio tímico medular es dependiente de la presencia de células linfoides. Así, en ratones SCID que no poseen células TcR $^+$  el epitelio medular es incapaz de madurar mientras que aquellos que contienen células TcR $^+$  producidas endógenamente (ratones SCID "leaky") o transferidas exógenamente a partir de médula ósea, el epitelio medular madura y se organiza expresando marcadores específicos (SHORES y col., 1991).

Los componentes principales del estroma tímico tanto en rata, objeto del presente estudio, como en ratón y en humano, las dos especies más investigadas al respecto, son las células epiteliales, los macrófagos y las células DC/IDC. Los tres tipos poseen distinto origen embrionario y una probada heterogeneidad tanto estructural como fenotípica.

Desde el punto de vista estructural el estroma epitelial consta de elementos irregulares, con largas prolongaciones citoplásmicas en la corteza y más cortas en la médula, unidos entre sí

mediante desmosomas y con abundantes filamentos en su citoplasma, que constituyen la red de soporte de las células linfoides. También aparecen en la médula células epiteliales hiperplásicas que, a veces, forman parte de corpúsculos de Hassall o estructuras císticas que representan otra entidad epitelial de la médula tímica (NABARRA y ANDRIANARISON, 1987). Esta heterogeneidad del componente epitelial tímico ha sido confirmada mediante la producción de numerosos anticuerpos monoclonales específicos, admitiéndose en la actualidad la existencia de, al menos, tres poblaciones epiteliales en el timo de mamíferos. Una forma el retículo de soporte en la corteza, otra está constituida por células de las zonas subcapsular, subtrabecular y subvascular y el epitelio medular y, por último, elementos epiteliales que forman parte de los corpúsculos de Hassall (revisado por KAMPINGA y col., 1989). A este respecto se asume igualmente que las células epiteliales medulares, incluyendo los corpúsculos de Hassall, y las subcapsulares son de origen ectodérmico mientras que el epitelio cortical proviene del endodermo (CROUSE y col., 1985; LOBACH y HAYNES, 1987; HAYNES, 1990).

Los macrófagos, células clásicamente incluidas en el denominado sistema mononuclear fagocítico, originadas a partir de monocitos de la médula ósea, son células grandes, irregulares, que frecuentemente contienen restos celulares en su citoplasma y que participan en los procesos de fagocitosis, presentación antigénica y en ciertas funciones efectoras. En el timo de rata, como en el caso del epitelio, los macrófagos muestran una heterogeneidad que pronto fué reconocida tanto a nivel estructural como histoquímico e histoenzimático (DIJVESTIJN & HOEFSEMIT, 1981; MILICEVIC y MILICEVIC, 1984; MILICEVIC y col., 1987; NABARRA y ANDRIANARISON, 1991). La misma heterogeneidad ha sido reconocida con la producción de varios anticuerpos monoclonales específicos para distintas subpoblaciones macrofágicas en varios órganos de rata, incluido el timo (RUMPOLD y col., 1982; WAKER y col., 1985; DIJKSTRA y col., 1985; ROBINSON y col., 1986; SMINIA y col., 1986; DAMOISEAUX y col., 1989; TAKEYA y col., 1989; COLIC y col., 1990; HSIAO y col., 1991). Quizás la existencia de heterogeneidad puede explicar las numerosas funciones propuestas para los macrófagos, entre ellas la liberación de señales para la maduración de precursores T (PAPIERNIK y col., 1987; INABA y col., 1988; MURWASKA y col., 1990), la eliminación de timocitos picnóticos (SPRENT y col., 1988), la educación positiva (BELLER y UNANUE 1978 y 1980; ZEIRA y GALLILY, 1988) y negativa (LORENZ y ALLEN, 1989), la inducción de células T supresoras (SOEJIMA y col., 1988), etc., sin que realmente se conozca de manera precisa su funcionalidad dentro del órgano.

Las células dendríticas fueron aisladas en primer lugar por STEINMAN y COHN (1973) de órganos linfoides de ratón y constituyen los principales elementos estimuladores de las células T

en el sistema inmune. Las células de Langerhans de la piel, las células "veiled" de la linfa aferente, las células dendríticas de la sangre, las células interdigitantes de la médula tímica y de las áreas T dependientes de los órganos linfoides periféricos y las células dendríticas aisladas de los órganos linfoides comparten entre sí la característica de ser potentes células presentadoras de antígenos (APC) a las células T. Su identificación se ha basado, además de en su capacidad funcional, en la fuerte expresión de moléculas del MHC de clase II que manifiestan, en su característica ultraestructura (DUIJVESTIJN y BARCLAY, 1984; DUIJVESTIJN y col., 1984) y en su histoquímica (SMINIA y col., 1986; KAMPINGA y ASPINALL, 1990), tanto in situ como in vitro. Aunque se han descrito anticuerpos monoclonales específicos de células dendríticas humanas y murinas (BREEL y col., 1987; BOFILL y JANOSSY, 1989), los existentes en rata, 1F119 (NAGELKERKEN y col., 1987) y TRPM-1 (TAKEYA y col., 1989) no son exclusivos de ellas.

Como en el caso de las células epiteliales y los macrófagos, ARKEMA (1992) ha sugerido recientemente la existencia de subpoblaciones de células dendríticas en el timo de rata. Esa misma heterogeneidad había sido descrita para las células dendríticas aisladas de sangre humana (PATTERSON y col., 1991) y previamente SCHULER y STEINMAN (1985) habían demostrado en ratón que las células dendríticas podían exhibir dos fenotipos funcionalmente distintos. También se han descrito dos subpoblaciones diferentes en el bazo de ratón (CROWLEY y col., 1989) y en la linfa aferente de rata (HOEFPSMIT y col., 1980; PUGH y col., 1983; FOSSUM, 1984). Aunque las células dendríticas han sido relacionadas funcionalmente con los procesos de selección negativa (READY y col., 1984; KAPPLER y col., 1987), algunos autores han sugerido que podrían estar implicadas también en la proliferación de timocitos medulares (KAMPINGA y ASPINALL, 1990).

El proceso de maduración de los precursores de las células T ha sido especialmente estudiado en ratón aunque los datos disponibles en otras especies, incluida la rata, confirman en general la secuencia murina. Así, en el ratón adulto, los precursores procedentes de la médula ósea llegan al timo donde expresan marcadores como Pgp1 (CD44), Thy-1 con baja intensidad y HSA, pero no expresan el receptor de la célula T (TCR). Una vez que llegan al timo sufren modificaciones que pueden ser seguidas gracias a la expresión secuencial de toda una serie de marcadores que suceden a lo largo del desarrollo intratímico. Así, FOWLKES y col. (1985) demostraron que los precursores intratímicos más tempranos en ratón se encuentran dentro de una población que representa sólo el 2-3% del total de los timocitos que no expresan las moléculas CD4 ni CD8 (células doble negativas, DN) aunque, por otro lado, parece existir un estadio anterior donde el timocito expresa, en bajos niveles, CD4 (WU y col., 1991).

La población DN no es homogénea y presenta diferencias respecto a la expresión de otros marcadores. Así, el 90% de las DN expresan HSA (CRISPE y col., 1987) y el restante 10% que no expresa HSA contiene células TcR  $\alpha\beta$  V $\beta$ 8<sup>+</sup>, TcR gamma- $\delta$ <sup>+</sup> y algunas TcR<sup>-</sup> Pgp1<sup>+</sup> (LESLEY y col., 1988).

Las células DN, HSA<sup>+</sup> contienen a su vez tres subpoblaciones que se pueden identificar por la diferente expresión que presentan de Pgp1 y el receptor de interleucina 2 (IL-2R). Las células DN, HSA<sup>+</sup>, Pgp1<sup>+</sup>, IL-2R<sup>-</sup> son capaces de colonizar el timo cuando se inyectan intravenosamente en animales irradiados y originan células maduras (LESLEY y col., 1988). Tan pronto como estas células comienzan a expresar IL-2R (cadena  $\alpha$ ), la molécula Pgp1 reduce su expresión en membrana de forma que un estado intermedio antes de la pérdida completa de Pgp1 implica la expresión de ambos (LESLEY y col., 1988). Por otro lado, la población DN, HSA<sup>+</sup>, Pgp1<sup>-</sup>, IL-2R<sup>+</sup> es capaz de repoblar el timo cuando se inyecta intratímica (SHIMONKEVITZ y col., 1987) e intravenosamente (LESLEY y col., 1988).

La expresión de IL-2R es transitoria (CEREDIG y col., 1985) y, a la vez que se produce la reducción en su expresión, aparecen en la membrana y con una expresión muy baja CD4 y CD8, células doble positivas, DP (HABU y col., 1985), a la vez que comienza a expresarse el complejo TcR/CD3, también en bajos niveles (NIKOLIC-ZUGIC y col., 1989). Posteriormente se produce un aumento en la expresión de CD4 y CD8 mediante un mecanismo todavía desconocido. El papel exacto que en toda esta primera etapa de la maduración T juegan los distintos componentes del estroma tímico es igualmente desconocido.

En relación con las moléculas CD4 y CD8, el último paso implica el aumento de expresión de CD8 y la pérdida de CD4 (linfocitos simple positivos, SP, CD8<sup>+</sup>, citotóxicos/supresores) o el aumento de expresión de CD4 y la pérdida de CD8 (linfocitos SP, CD4<sup>+</sup>, colaboradores), proceso que vendría determinado probablemente por la unión del timocito a moléculas del MHC de clase I ó II respectivamente, expresadas en las células del estroma (HUGO y col., 1990).

La expresión del receptor de la célula T (TcR) en las células DP inicia una etapa fundamental para la selección positiva y negativa de los timocitos en la que la expresión de las moléculas del MHC en la superficie de las células del estroma es crucial. Consecuentemente se han utilizado distintas aproximaciones experimentales que permiten en cierta medida analizar cuándo se producen los procesos de selección positiva y negativa, qué células del estroma tímico participan y qué mecanismos están implicados en los mismos.

Así, el fenómeno de la selección positiva ha sido demostrado tanto con quimeras de irradiación como con ratones transgénicos. En ambos casos la idea es analizar la maduración funcional de timocitos de un determinado haplotipo en un microambiente tímico que expresa otro haplotipo diferente.

Los precursores hematopoiéticos de la médula ósea de un animal pueden ser eliminados por irradiación utilizando dosis que, por el contrario, no afectan aparentemente al epitelio tímico. Cuando estos animales son reconstituidos con células de médula ósea alogénica o semialogénica, las células T que producen sólo son capaces de responder a antígenos presentados por moléculas del MHC del huésped; es decir, están restringidas, educadas o seleccionadas positivamente, por el MHC expresado en el epitelio radiorresistente del timo del huésped (BEVAN y FINK, 1978). Las críticas a este tipo de experimentos han venido del hecho de que la irradiación, por un lado, sí podría afectar al estroma epitelial tímico y, por otro, posiblemente podría no eliminar completamente las células hematopoiéticas del huésped.

En el caso de ratones transgénicos que reciben genes del TcR con una reordenación única y conocida todos los timocitos expresan dicho receptor independientemente del haplotipo del ratón huésped, mientras que los linfocitos periféricos sólo expresan dicho receptor cuando el haplotipo del ratón transgénico es igual al del ratón donante de los transgenes TcR (KISIELOW y col., 1988). En este mismo sentido, los ratones que expresan moléculas codificadas por la región I-E del MHC de clase II no tienen en la periferia linfocitos con receptores que utilizan los segmentos  $V_{\beta}11$  y  $V_{\beta}17$ , reconocidos por anticuerpos monoclonales específicos. Sin embargo, en cepas que no expresan dicho haplotipo, el número de linfocitos con tales especificidades varía dependiendo del haplotipo, demostrando la existencia de una selección positiva variable (BLACKMAN y col., 1990).

Como ya apuntaban los resultados obtenidos con las quimeras de irradiación el epitelio tímico parece jugar un papel esencial en los procesos de restricción. Así, ratones transgénicos que expresan I-E en el epitelio tímico, irradiados y reconstituidos con células de médula ósea de distinto haplotipo producen células T que sólo reconocen antígenos en el contexto I-E (BLACKMAN y col., 1990).

Dos parecen ser los mecanismos por los que se produce la eliminación funcional de los clones T autorreactivos. Ambos requieren elementos del estroma tímico, en cierta medida no bien identificados, y la utilización de uno u otro podría depender del antígeno en cuestión. En un

caso se induce un proceso de anergia en los timocitos que les permite madurar y migrar fuera del timo pero que les inactiva funcionalmente, impidiéndoles reaccionar contra el MHC propio (RAMSDELL y FOWLKES, 1990). En otros casos los timocitos autorreactivos son eliminados dentro del timo, lo que implica su muerte programada mediante un proceso de apoptosis. El ejemplo más evidente de este hecho es que las células T V $\beta$ 17a positivas, que reconocen antígenos I-E de clase II, no aparecen en la periferia de aquellas cepas de ratón que expresan este haplotipo (KAPPLER y col., 1987).

La mayoría de los datos apuntan a que los procesos de eliminación clonal están mediados por las células dendríticas del estroma tímico (BLACKMAN y col., 1990). El papel del epitelio tímico en el proceso es más controvertido. En ratones irradiados que expresan I-E se ha sugerido que el epitelio radiorresistente era el responsable de la anergia clonal observada en clones periféricos V $\beta$ 17 positivos (RAMSDELL y FOWLKES, 1990). Otros autores, con experimentos *in vitro*, han indicado que las células epiteliales participan en los procesos de selección negativa, al menos para antígenos del MHC de clase II, pero no así en el caso de moléculas de MHC de clase I ni de superantígenos (WEBB y SPRENT, 1990). También en pollo se ha sugerido que el epitelio juega un papel en la inducción de tolerancia. Así, tejidos de codorniz trasplantados en pollo son rechazados salvo cuando los pollos son timectomizados e injertados con primordio tímico de codorniz que sólo posee células epiteliales (OHKI y col., 1987 y 1988).

Recientemente algunos autores han apuntado que las células B intratímicas también podrían influir en la selección del repertorio T (MARTINEZ-A. y col., 1988; MAZDA y col., 1991) y MATSUHASHI y col. (1991) demuestran que los propios linfocitos T pueden inducir tolerancia para moléculas del MHC de clase I.

Aunque los resultados comentados hasta aquí sugieren un papel fundamental de las células del estroma tímico en la maduración T, la presencia de células T en bazo y ganglio linfático de ratones atímicos "nude" (LAKE y col., 1991) y de células gamma- $\delta^+$  en pacientes con síndrome de Di George (VAN DONGEN y col., 1990) sugiere que podría haber vías extratímicas de maduración de linfocitos T. Asimismo, ROCHA y col. (1991) demuestran que parte de los linfocitos intraepiteliales en animales normales tienen un origen extratímico. Por último cabe destacar que también se han descrito fenómenos tanto de selección positiva (SPEISER y col., 1992) como negativa (ABROMSON-LEEMAN y DORF, 1991) en ratones "nude". Todos estos resultados sugieren que en ausencia del timo otros tejidos podrían encargarse del mantenimiento de la tolerancia a lo propio.



Otra de las posibles vías para el conocimiento de la función de las células del estroma del timo ha sido la utilización de cultivos in vitro que, si bien presentan el inconveniente de que los resultados puedan no ser extrapolados a lo que ocurre in vivo, presentan la evidente ventaja de ser fácilmente manipulables. En este sentido el número de trabajos en los que se describen tanto cultivos realizados con diferentes metodologías como líneas celulares tímicas han sido muy numerosos en los últimos años. Sin embargo muchos de los resultados son contradictorios, principalmente debido a la dificultad para identificar satisfactoriamente y de manera reproducible los componentes celulares presentes no sólo en los cultivos primarios sino incluso en las líneas celulares.

Los cultivos organotípicos de timo fetal han demostrado ser una herramienta básica en estudios de diferenciación intratrímica en el caso del ratón (KINGSTON y col., 1985; SKINNER y col., 1987; CEREDIG, 1988; WATANABE y col., 1989; PLUM y col., 1989; WAANDERS y col., 1989; PLUM y col., 1990; WOOD y col., 1990; PLUM y col., 1991). En este tipo de cultivo se sitúan lóbulos fetales completos sobre un filtro de policarbonato de forma que, por debajo, recibe el aporte de los elementos presentes en el medio de cultivo y por encima el fragmento está en contacto con el ambiente del incubador, lo que permite un intercambio gaseoso efectivo. Desde un punto de vista técnico se ha demostrado que hay dos factores básicos que influyen de forma decisiva en este tipo de cultivos: el tamaño de los fragmentos debe permitir una eficacia máxima de intercambio de nutrientes y gases y, además, es necesario mantener el explante en una interfase aire-líquido sin que el medio llegue a cubrir totalmente el fragmento (JENKINSON y col., 1982; JENKINSON y OWEN, 1990). Este tipo de cultivos permite la diferenciación de precursores T hasta el estadio de células T SP (ROBINSON y OWEN, 1976; KISIELOW y col., 1984) y la expresión de las cadenas  $\alpha\beta$  del TcR (OWEN y col., 1986). Por otro lado también se ha testado el papel de las interleucinas en este sistema obteniendo resultados contradictorios, al menos en lo referente al papel de IL-2: por un lado anticuerpos anti-IL-2R inhiben la proliferación celular (PLUM y col., 1989), que se recupera tras la adición al medio de interleucina 2 recombinante (rIL-2) y, por otro, la rIL-2 ha demostrado tener una acción inhibitoria en la proliferación (SKINNER y col., 1987). También la IL-4, que produce una disminución en la producción de timocitos y la completa eliminación de las células DP (PLUM y col., 1990) y la IL-7, que produce un aumento al doble de los timocitos producidos respecto a los fragmentos cultivados sin suplementos (WATSON y col., 1989), han demostrado influir en los procesos de diferenciación en este modelo.

Además de estudiar los procesos de diferenciación dentro del fragmento esta aproximación permite obtener timos quiméricos para el estudio de los procesos de restricción y tolerancia: el

fragmento puede ser tratado con productos como la 2'-desoxiquanosina (dGuo), que aparentemente elimina de forma selectiva linfocitos y células dendríticas, y obtener un estroma epitelial de un haplotipo determinado que, en esta situación, puede ser repoblado con precursores linfoides de diferente haplotipo (JENKINSON y col., 1982; READY y col., 1984; WATANABE y col., 1989; WEBB y SPRENT, 1990). Utilizando esta aproximación se ha descrito, incluso, la diferenciación de precursores linfoides humanos en un estroma de ratón (FISHER y col., 1990). En este caso el papel jugado por las moléculas del MHC que antes señalábamos como fundamental para la educación de las células T queda en entredicho.

Histológicamente se ha descrito que los fragmentos tratados con dGuo están compuestos básicamente de un estroma epitelial sin linfocitos, macrófagos o IDC (JENKINSON y col., 1982; READY y col., 1984). Estos fragmentos mantienen su capacidad biológica puesto que cuando se ponen en la cercanía, pero sin que haya contactos celulares, de tejidos donantes de células "stem", como timo o hígado fetales, son capaces de atraer estos precursores (JENKINSON y col., 1982; JENKINSON y OWEN, 1990).

Una segunda aproximación en el cultivo de tejidos de timo consiste en trocear el timo en pequeños fragmentos y cultivarlos en suspensión, metodología que ha sido fundamentalmente utilizada en los estudios de recuperación de la función T de ratas "nude" (SCHUURMAN y col., 1985, 1986 y 1987). En este caso la citoarquitectura tímica se pierde después de una semana de cultivo y el fragmento está básicamente compuesto por un componente epitelial entre una matriz de colágeno sin linfocitos. Al igual que en el caso de los cultivados sobre filtros estos fragmentos mantienen su capacidad biológica puesto que si el fragmento cultivado en suspensión se deja adherir a una superficie se obtiene un cultivo puro de células epiteliales cuyo sobrenadante es capaz de aumentar la estimulación de timocitos inducida con mitógenos (SCHUURMAN y col., 1982).

Si bien el método utilizado en los cultivos organotípicos descritos previamente mimetiza muchos de los acontecimientos que ocurren en la diferenciación T, impide la proliferación de los elementos del estroma tímico sobre el filtro. Por otro lado los cultivos realizados en suspensión, que permiten la recuperación de las respuestas T en animales atímicos, son homogéneos en su composición y prácticamente están compuestos sólo por células epiteliales. Además, en muchas ocasiones, los períodos durante los que los fragmentos se mantienen en cultivo, el tipo de tejido utilizado (fetal/adulto) y la especie objeto de estudio hace que los resultados obtenidos varíen considerablemente. Todos estos inconvenientes han hecho optar por una tercera aproximación que ha permitido una mejor caracterización de los diferentes elementos del estroma del timo

consistente en realizar cultivos primarios de estroma tímico. Estos implican trocear el timo y colocar los fragmentos sobre superficies de plástico especialmente tratado que permite la adherencia del fragmento y la proliferación de las células estromáticas. Los resultados obtenidos en cuanto a la proliferación de los diferentes tipos celulares con este sistema son, sin embargo, nuevamente variables. Así, en cultivos de estroma tímico de rata y ratón se ha descrito tanto un desarrollo de células epiteliales (ITOH, 1979; LOOR, 1979; MIYAZAWA y col., 1980; NIEBURGS y col., 1985; SAVINO y col., 1986; NAQUET y col., 1989; ESHEL y col., 1990; SCHREIBER y col., 1991) como un desarrollo preferente de macrófagos (PAPIERNIK y col., 1983; COLIC y col., 1991) mientras que en el caso humano, por el contrario, se ha descrito un crecimiento casi exclusivo de células epiteliales (COHEN y col., 1984; SUN y col., 1984; BARTHELEMY y col., 1986; SAVINO y col., 1986; BALERCIA y col., 1990b; SCHREIBER y col., 1991).

Una manera relacionada con la anterior que también permite el estudio de poblaciones celulares del estroma implica la obtención de líneas celulares en cultivos secundarios a partir de los cultivos primarios descritos. En el caso de cultivos secundarios de células accesorias de ratón esta aproximación ha permitido apuntar la importancia que estas células pueden tener en la diferenciación intratímica (PAPIERNIK y col., 1983). Así, las interacciones entre linfocitos inmaduros y células accesorias PTR (células fagocíticas del retículo tímico) en ratón están mediadas por la molécula Mac-1 (EL ROUBY y col., 1985; EL ROUBY y col., 1988) y las propias PTR son capaces de inducir proliferación de timocitos DN en presencia de IL-2 (PAPIERNIK y col., 1987). En otras ocasiones han sido los mediadores solubles presentes en los sobrenadantes de los macrófagos los que han permitido inducir la diferenciación de células T inmaduras del estado DN al DP y SP (NAGAMINE y col., 1991). Asimismo hay numerosos trabajos que describen la diferenciación in vitro de células precursoras de células T en presencia de líneas epiteliales y, en algunas de ellas, esta diferenciación implica la presencia de mediadores solubles producidos por las células epiteliales y secretados al medio de cultivo (PALACIOS y col., 1989; DALLOUL y col., 1991; WATANABE y col., 1991).

Por último, también se han conseguido obtener células de estroma tímico con métodos enzimáticos que permiten disgregar los componentes del timo tras los que se puede realizar una separación mediante gradientes de densidad y sometiendo a la fracción de baja densidad, compuesta básicamente de macrófagos y células dendríticas, a procesos de adherencia (CROWLEY y col., 1989).

Desde un punto de vista diferente pero complementario al de los estudios in vitro, la posible función de los componentes del estroma de timo también se ha estudiado mediante

experimentos in vivo. Pese la dificultad que puede implicar la interpretación de los resultados debido a que entran en juego factores que no influirían in vitro, es evidente que los resultados in vitro no pueden ser tomados como absolutos sino que el paso posterior implica la comprobación de los mismos en el modelo animal. Desde este punto de vista el trasplante de diferentes componentes del estroma ha demostrado ser muy útil para el esclarecimiento de la función que cada uno de ellos juega en la funcionalidad tímica.

En este sentido la aparición de la mutación "nude" (PANTELOURIS, 1968; FESTING y col., 1978) permitió disponer de animales que carecían de un timo funcional por sufrir un fallo en el desarrollo embrionario, lo que ha servido para resolver algunos de los problemas planteados.

Los animales atímicos "nude" son mutantes recesivos autosómicos incapaces de desarrollar una respuesta inmune celular in vivo tras inmunización con antígenos T dependientes, pero que mantienen intacta la posibilidad de establecer una respuesta inmune humoral. En el rudimento tímico de estos animales se observan algunas células epiteliales indiferenciadas y pequeños quistes rodeados de células epiteliales cuboidales y conductos (FOSSUM y col., 1980; VOS y col., 1980a; HOUGEN y KLAUSEN, 1984).

En el caso de la rata los órganos linfoides periféricos de animales jóvenes tienen un peso similar a los de las ratas normales (HOUGEN y KLAUSEN, 1984) pero las zonas T dependientes están prácticamente vacías, no hay centros germinales en áreas B y el número de linfocitos circulantes está muy reducido (BROOKS y col., 1980; DOUGLAS-JONES y col., 1981). Aunque el porcentaje de células que se tiñen con anticuerpos monoclonales dirigidos contra linfocitos T es inferior al que se obtiene en ratas eutímicas, aumenta con la edad (BROOKS y col., 1980; VAESSEN y col., 1986). Por el contrario, y aunque no se conoce dónde pueden adquirir este marcador, el porcentaje de células Thy-1\* en ratas "nude" es similar al de ratas normales desde el nacimiento y el de células B es incluso superior (SCHUURMAN y col., 1982; FOSSUM y col., 1983; SCHUURMAN y col., 1985).

Inmunológicamente, las ratas "nude" exhiben una nula o muy baja estimulación de los linfocitos periféricos a mitógenos, sin producción de IL-2 (BROOKS y col., 1980; FESTING y col., 1978; HOUGEN y KLAUSEN, 1984), no muestran alorreactividad en cultivo mixto de linfocitos, MLR (BROOKS y col., 1980; SFAKSI y col., 1985) ni son capaces de responder en procesos de hipersensibilidad retardada (DTH) contra antígenos típicamente inductores de la respuesta T como ovoalbúmina, tuberculina o toxina tetánica (VOS y col., 1980b; SCHUURMAN y col., 1985). Por otro

lado no rechazan trasplantes de piel xenogénica o alogénica (FESTING y col., 1978; BELL y col., 1987), los niveles de IgG en suero están reducidos en un 30-50% respecto a las ratas eutímicas (VOS y col., 1980b) y sus linfocitos T no generan reactividad injerto contra huésped (GVHD) en huéspedes eutímicos alogénicos (MARSHAL y MILLER, 1981).

Mientras que las respuestas T están muy reducidas respecto a las de ratas normales, producen respuestas normales a lipopolisacárido (LPS) de *E. Coli* (VAN LOVEREN y col., 1988) e incluso la actividad "natural killer" (NK) es superior a la de las ratas normales (ROLSTAD y FOSSUM, 1990).

En este modelo se han ensayado diferentes aproximaciones para conseguir una recuperación de la función T tales como el trasplante de timo completo (HOUGEN y KLAUSEN, 1987; HOUGEN y col., 1987) o de fragmentos de timo cultivados (SCHUURMAN y col., 1982 y 1985) y la inyección de suspensiones celulares purificadas de linfocitos (BELL y col., 1987).

Tanto con el trasplante de timo completo como con el de fragmentos de timo cultivados y tanto en combinaciones singénica como alogénica, se logra una repoblación de las áreas T dependientes de los órganos linfoides periféricos y una recuperación de las respuestas T. En ambos casos se consigue un aumento de las células T en la periferia que producen una respuesta a mitógenos similar a la que los linfocitos periféricos producen ratas normales eutímicas (SCHUURMAN y col., 1982; HOUGEN y KLAUSEN, 1987; HOUGEN y col., 1987; SCHUURMAN y col., 1987). Asimismo, el animal trasplantado rechaza trasplantes de piel alogénica y adquieren DTH contra antígenos T dependientes.

Tanto en rata como en ratón se ha demostrado in vitro que los animales "nude" trasplantados muestran tolerancia hacia el haplotipo del huésped, lo que se piensa se debe a la colonización del fragmento trasplantado por macrófagos/células dendríticas del huésped (SCHUURMAN y col., 1986 y 1987; JENKINSON y OWEN, 1990). Los resultados respecto a la tolerancia generada hacia el haplotipo donante expresado en las células epiteliales trasplantadas son más contradictorios. En el caso de la rata, SCHUURMAN y col. (1986) encuentran que se produce un estado de alorreactividad in vitro pero de tolerancia in vivo hacia el haplotipo del fragmento alogénico trasplantado. Estos autores indican que en la corteza del fragmento trasplantado el haplotipo de las moléculas del MHC de clase II es donante (en las células epiteliales) mientras que en la médula es del huésped (en las IDC). Respecto a la expresión de moléculas del MHC de clase I, y excluyendo a los tímocitos, hay expresión de clase I del haplotipo donante tanto en la

corteza como en la médula (en las células epiteliales) mientras que el haplotipo del huésped estaba restringido a la médula. Estos resultados sugieren una tolerancia in vivo sin eliminación clonal de las células alorreactivas, especulándose bien con las existencia de diferentes mecanismos de presentación del MHC o bien con la existencia de señales de tolerización provenientes del fragmento trasplantado. No obstante, resultados más recientes (SCHUURMAN y col., 1989) ponen en entredicho esta segunda posibilidad. Probablemente, como apuntan HOFFMANN y col. (1992) en experimentos que confirman estos mismos resultados, la afinidad de los clones generados sea demasiado débil para reconocer aloantígenos in vivo (tolerancia a trasplantes de piel) pero suficiente para reconocer esos mismos aloantígenos en experimentos in vitro (CML<sup>+</sup>).

Una condición radicalmente diferente es la que se produce cuando los fragmentos cultivados se trasplantan en ratones eutímicos. En este caso los fragmentos de timo fetal cultivados organotípicamente en un medio de cultivo estándar (control) eran rechazados cuando se trasplantan en combinación alogénica, mientras que si el cultivo se realizaba con dGuo 1,35mM durante 5 días no se producía el rechazo (READY y col., 1984). Los fragmentos tratados con dGuo estaban básicamente constituidos por células epiteliales y, en bajo número, por macrófagos y fibroblastos. En ningún caso se observaban linfocitos o, si estaban presentes, tenían aspecto necrótico y no había células con características similares a las IDC descritas in situ en la médula tímica. Si el período de cultivo era más corto la desaparición de los linfocitos no era completa y si, por el contrario, se mantenían por períodos más largos las células epiteliales podían verse afectadas (JENKINSON y col., 1982; READY y col., 1984). Además, utilizando como marcador el aloantígeno Thy-1 se comprueba que la colonización de los fragmentos tratados no se producía por la proliferación de linfocitos que pudiesen haber escapado al efecto de la dGuo sino que se repoblaban con linfocitos provenientes del tejido donante de células "stem" (JENKINSON y col., 1982).

Este distinto comportamiento de los dos tipos de fragmentos se explicaba aduciendo que la dGuo eliminaba del fragmento tratado no sólo linfocitos sino también las células dendríticas, aunque las células epiteliales de los fragmentos control y tratados con dGuo seguían expresando moléculas del MHC de clase I y II (READY y col., 1984). En definitiva que, mientras que el haplotipo del epitelio tímico trasplantado no parece tener relevancia, algo ya señalado en los experimentos con ratas "nude" (SCHUURMAN y col., 1986), la presencia o ausencia de IDC determinaba el rechazo o no del fragmento trasplantado.

Una prueba, aunque indirecta, que parecía corroborar esta idea es que si el número de fragmentos tratados con dGuo trasplantados en un mismo huésped, era muy alto (y por tanto cabría esperar que el número de DC o de sus precursores que pudiesen haber escapado al tratamiento, fuese alto) sí se producía el rechazo (BUCKLEY y col., 1988). Finalmente, en otra serie de experimentos en los que los ratones que iban a ser trasplantados con fragmentos tratados con dGuo eran inyectados previamente con un número variable de células dendríticas purificadas de bazo, sí se producía rechazo si el número de DC era suficientemente alto. Así, la inyección de 10.000 DC provocaba el rechazo de los fragmentos tratados con dGuo en un 75% de los casos mientras que si la inyección era de 100.000 DC el rechazo afectaba a la totalidad de los trasplantes (BENSON y col., 1987).

Al contrario de lo encontrado en ratón, los resultados con fragmentos tímicos tratados con dGuo y trasplantados en ratas eutímicas en combinaciones alogénicas son radicalmente distintos: los fragmentos de timo de rata tratados tanto con la dosis habitualmente utilizada en ratón (1,35mM) como con la dosis que en rata demuestra eliminar completamente la proliferación de linfocitos estimulados con mitógenos (4,0mM), son rechazados cuando se trasplantan en ratas eutímicas en combinación alogénica (GEORGIOU y BELLGRAU, 1989). En este caso, al contrario que lo descrito en ratón, el rechazo no se produce por la eliminación de las DC, sino por la persistente inmunogenicidad que muestra el epitelio, incluso después del período de cultivo. Así, cuando los fragmentos cultivados con 4,0mM de un determinado haplotipo ( $RT1^a$ ) se trasplantaban en un huésped alogénico ( $RT1^c$ ) que había sido timectomizado, letalmente irradiado y reconstituido con médula ósea singénica ( $RT1^c$ ) sin células T ("atxbm"), no eran rechazados. A la vez, el fragmento era colonizado por células provenientes de la médula ósea del huésped ( $RT1^c$ ). Si después de largos períodos de tiempo (más de un año) se extraía este fragmento y se realizaba un segundo trasplante en un huésped de haplotipo  $RT1^c$  pero inmunocompetente, ahora sí se producía el rechazo. En este caso el rechazo no se había producido porque el fragmento extraído del huésped "atxbm" tuviese DC puesto que estas DC y el animal inmunocompetente eran de igual haplotipo ( $RT1^c$ ) (GEORGIOU y BELLGRAU, 1989). Por tanto los autores argumentaron que el rechazo se había debido a que el epitelio, que seguía expresando moléculas del MHC, era fuertemente inmunogénico.

A estas diferencias entre especies hay que añadir que los efectos de la dGuo, y de otros inmunosupresores utilizados en este tipo de experimentos en los cultivos tímicos, son escasamente conocidos, habiéndose interpretado éstos a posteriori a tenor de los resultados obtenidos una vez que los fragmentos eran trasplantados. En realidad, la 2'-desoxiguanosina es un metabolito de la ruta de síntesis de las purinas que se fosforila en dos pasos sucesivos a dGTP mediante una

quinasa que también fosforila desoxicitidina (dCyt) mientras que el dGTP puede ser degradado a dGuo mediante la enzima 5'-nucleotidasa. Por otro lado, la guanina puede transformarse en guanosina o 2'-desoxiguanosina mediante la PNP y la adenosina y 2'-desoxiadenosina pueden ser desaminadas a hiposantina ribonucleósido mediante la ADA (COHEN y col., 1980; FAIRBANKS y col., 1990). Las enzimas que intervienen en estas rutas no se distribuyen por igual en diferentes tejidos. Así, de los estudios llevados a cabo con suspensiones de linfocitos humanos, los timocitos han demostrado ser muy sensibles a la dGuo acumulándola en su citoplasma al contrario que linfocitos de sangre periférica o células B. Además, los timocitos son incapaces de degradar el exceso de dGTP que consiguientemente se produce. Este exceso de dGTP, junto con la reducción de nucleótidos trifosfato de citidina que ello ocasiona conduce a una detención de la síntesis de ADN y a la muerte celular (BROX y col., 1984; SETO y col., 1985; KIZAKI y col., 1988; FAIRBANKS y col., 1990).

Otros productos que han demostrado tener efectos sobre linfocitos y DC son la ciclosporina A (CsA) y el bis(tri-n-butiltín)óxido (TBTO).

La CsA parece tener un efecto selectivo y reversible sobre linfocitos T colaboradores actuando mediante la inhibición de la producción de IL-2, aunque también disminuye la producción de IFN-gamma, GM-CSF e IL-4 (FEUTREN, 1989). A nivel celular induce la desaparición de timocitos SP Tcr  $\alpha\beta^+$ , sin afectar aquellos que expresan el Tcr gamma- $\delta$ , ni los DN, DP ni el paso de DN a DP (GAO y col., 1988; KOSUGI y col., 1989; MATSUHASHI y col., 1989; TAKEUCHI y col., 1990). Histológicamente hay una desaparición de la médula tímica con la consiguiente eliminación de las IDC y linfocitos maduros (SCHUURMAN y col., 1990) y una drástica disminución en la expresión de moléculas del MHC en el estroma, principalmente en las IDC medulares pero también en las células epiteliales (BESCHORNER y col., 1987; SAKAGUCHI y SAKAGUCHI, 1988; HIRAMINE y col., 1989). Al menos in vitro esta disminución está mediada por IFN-gamma (HALLORAN y col., 1989).

Finalmente, el bis(tri-n-butiltín)óxido (TBTO) es un componente selectivamente tóxico para los timocitos tanto in vivo como in vitro (VOS y col., 1984). Administrado in vivo produce atrofia tímica, la eliminación de linfocitos de bazo y ganglios linfáticos y linfopenia en sangre. El efecto, que es reversible (VAN LOVEREN y col., 1991), se debe de forma directa a la disminución del flujo de linfocitos desde el timo a la periferia y a la muerte de linfocitos intratímicos afectándose, además, in vitro pero no in vivo las células de la médula ósea (VOS y col., 1984).



## **PROPOSITO**

A pesar de los numerosos datos y pruebas indirectas, muchas de ellas incluidas en la INTRODUCCION de este trabajo, que sugieren un papel fundamental para los distintos componentes del estroma en la funcionalidad tímica, continúa sin aclararse definitivamente el verdadero papel jugado por cada uno de ellos en los procesos de diferenciación y maduración de las células T. Este problema se debe, en parte, a una incompleta e incorrecta caracterización de los componentes de dicho estroma cuya heterogeneidad se confirma día a día.

De las distintas aproximaciones experimentales que, como ya hemos comentado, existen para abordar estos problemas nosotros hemos elegido dos que globalmente constituyen el PROPOSITO de este trabajo de Tesis Doctoral:

1. La obtención y caracterización de cultivos primarios de estroma tímico de rata, con especial hincapié en los macrófagos y células dendríticas y su relación con otras células presentes en los cultivos, cuyo papel en los fenómenos intratímicos es especialmente desconocido.

2. El comportamiento que dichos cultivos, tratados o sin tratar con drogas que pueden afectar la presencia de algunos elementos celulares en los mismos o la expresión de moléculas consideradas importantes en los fenómenos de reconocimiento alogénico, tienen in vivo al ser trasplantados en combinaciones singénica y alogénica en animales eutímicos y atímicos.

Para llevar a cabo estos objetivos propuestos los protocolos experimentales que se aplicarán serán los siguientes:

1. Caracterización fenotípica y morfológica de cultivos primarios de estroma tímico de rata a diferentes tiempos de cultivo. Esta caracterización incluirá el estudio, con microscopio de contraste de fases, de la evolución temporal de los cultivos, el análisis ultraestructural de cada tipo celular y la determinación de su fenotipo en las distintas fases del mismo mediante inmunomarcajes con anticuerpos específicos e histoquímica.

2. La caracterización morfo-fenotípica de los macrófagos y células dendríticas presentes en los cultivos será contrastada con la observada en ambos tipos celulares cuando se aíslan directamente del timo de rata y la población enriquecida se cultivará en medio de cultivo estándar o suplementado con citocinas (rIL-2 o sobrenadante de cultivos de esplenocitos tratados con Con A) que podrían jugar in vivo un papel importante en la diferenciación intratímica.

3. Caracterización de cultivos primarios de estroma tímico de rata tratados con distintas dosis de dGuo analizándose, a distintos tiempos, la presencia en ellos de células dendríticas y la expresión de moléculas del MHC de clase II.

4. Caracterización morfológica de los fragmentos tímicos cultivados en diferentes condiciones:

4a. Adheridos al sustrato de cultivo.

4b. Cultivados en suspensión.

4c. Cultivados en medios estándar o suplementados con distintas drogas (dGuo, CsA, TBT0).

Esta caracterización incluirá el estudio morfológico de cortes en parafina de fragmentos cultivados, el análisis ultraestructural de los mismos y el estudio fenotípico de sus componentes celulares sobre secciones congeladas utilizando anticuerpos específicos.

5. Análisis a distintos tiempos del comportamiento in vivo de los fragmentos cultivados, tratados o no con las drogas antes mencionadas, trasplantados bajo la cápsula renal de ratas eutímicas o atímicas ("nude"), singénicas o alogénicas.

Dicho análisis incluirá, además del control del rechazo o supervivencia del tejido trasplantado, el estudio de los cambios histológicos, ultraestructurales y fenotípicos experimentados por los fragmentos en las distintas combinaciones mencionadas, con especial énfasis en el origen (huésped o donante) de las células presentes en el fragmento.

## **MATERIALES Y METODOS**

## I. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Para la caracterización de los cultivos primarios de estroma, análisis de las células dendríticas y macrófagos directamente aislados de timo y para el estudio de los fragmentos cultivados adheridos al soporte de cultivo con y sin dGuo se utilizaron ratas Wistar adultas de 6 a 8 semanas de edad, nacidas y mantenidas en nuestro estabulario.

## II. CULTIVOS PRIMARIOS.

Los timos se extrajeron tras anestesiarse las ratas con éter y se cortaron en pequeños fragmentos que fueron lavados repetidamente para eliminar el mayor número posible de linfocitos, colocándose en frascos de 25 cm<sup>2</sup> durante 15 a 20 min. sin medio para favorecer su adherencia al plástico. Posteriormente se añadió medio RPMI-1640 (Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, U.K.) suplementado con 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato sódico, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, y 10% de FCS (Flow) descomplementado a 57°C durante 30 min. Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y el medio se cambió dos veces por semana.

## III. CARACTERIZACION DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS.

Los cultivos se observaron y fotografiaron diariamente con un microscopio de contraste de fases (Nikon TMS).

### IIIa. Caracterización fenotípica de los marcadores de superficie y citoplásmicos.

La determinación de los marcadores de superficie y citoplásmicos expresados por los distintos tipos celulares presentes en los cultivos se realizó mediante peroxidasa de acuerdo al siguiente protocolo: los cultivos fijados con PLPG (APENDICE 1, a continuación de MATERIALES Y METODOS) durante 2 horas, se lavaron 15 min. con PBS (APENDICE 1) y se incubaron con los anticuerpos listados en la TABLA 1 durante 1 hora. La actividad peroxidasa endógena fue bloqueada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% en metanol durante 10 min. Para los anticuerpos monoclonales producidos en ratón los cultivos se incubaron a continuación con suero normal de conejo al 1% en PBS durante 30 min. y se lavaron durante 15 min. con PBS. Posteriormente se incubaron con Ig de conejo anti-Ig de ratón (Dako Co., Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1/100 en PBS durante 30 min. Para detectar el anticuerpo policlonal anti-citoqueratina se utilizó una segunda capa con Ig de cabra anti-Ig de conejo (Sigma Co., St. Louis, MO) a 1/20 durante 30 min. y una tercera con Ig de conejo anti-peroxidasa conjugadas con peroxidasa (Dako) a 1/40 durante 30 min. La reacción final se desarrolló con 3,3'-diaminobencidina (DAB) (APENDICE 1).

En algunos cultivos se realizó una tinción doble con anticuerpos anti-citoqueratina y anti-vimentina: primero se llevó a cabo la detección de citoqueratina de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente y la reacción final se desarrolló con DAB, produciéndose un depósito de color marrón. A continuación el cultivo se incubó con el anticuerpo anti-vimentina siguiendo también igual protocolo al descrito previamente pero la reacción final se desarrolló con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) dando lugar a un color rojo (APENDICE 1).

#### IIIb. Determinación de la proliferación celular.

La proliferación celular en el cultivo se determinó de acuerdo a su capacidad para incorporar BrdU. Los cultivos de estroma tímico se incubaron con 15 µg/ml de BrdU (Sigma) en RPMI-1640 suplementados con 10% de FCS durante una noche a 37°C, fijándose a continuación con etanol al 70% durante 30 min. y tratándose con HCl 2N durante 20 min. a temperatura ambiente. Por último se lavaron con PBS repetidamente. Posteriormente se trataron con Triton X-100 (Sigma) al 0,5% en PBS durante 20 min. y se lavaron de nuevo con PBS. La actividad peroxidasa endógena se inhibió con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% en metanol durante 15 min. La BrdU fue detectada mediante inmunodetección indirecta con peroxidasa siguiendo el protocolo ya descrito, tras la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-BrdU (TABLA 1) que se incubó a 4°C durante una noche.

#### IIIc. Preparación de los cultivos para microscopía óptica y electrónica.

Los cultivos se fijaron en glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato 0,1M (APENDICE 1) durante 3 horas, se lavaron en una solución de cacodilato 0,2M con sacarosa al 1% a pH 7,3 durante una hora y se posfijaron en tetróxido de osmio al 2% en tampón Millonig II (APENDICE 1) a pH 7,3 durante 1 hora. Posteriormente se lavaron en el mismo tampón Millonig II durante 30 min. y se deshidrataron en etanol de 50% durante 30 min., 70% (30 min.), 96% (30 min.) y 100% (45 min.). Para la inclusión se trataron con una mezcla 1:1 de etanol 100% y Epon 812 (TAAB, Berkshire, U.K.) durante 1 hora, Epon 812 durante 1 hora a 37°C y 12 horas a temperatura ambiente. La polimerización se llevó a cabo a 70°C. Los cortes se obtuvieron en un ultramicrotomo Ultracut-E (Reichert-Jung, Wien, Austria). Para su estudio a microscopía óptica los cortes semifinos (1 µm) se tiñeron con una solución básica de azul de toluidina al 1%. Las secciones ultrafinas (30-50 nm) se recogieron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo al 2% en agua destilada durante 1 hora y con citrato de plomo (APENDICE 1) 10 min. siendo posteriormente observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico JEOL-100B del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la U.C.M. y con un JEOL-200F<sub>x</sub> y un ZEISS-EM-902 del Centro de Microscopía Electrónica de la U.C.M.

Algunos de los cultivos en los que se realizó inmunohistoquímica se procesaron para microscopía electrónica. Tras finalizar la inmunodetección, estos cultivos se fijaron en glutaraldehído 3% en tampón cacodilato 0,1M y se incluyeron en Epon siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente.

#### IIIId. Histoquímica.

Las actividades fosfatasa ácida (APH) y esterasa inespecífica (NSE) se determinaron de acuerdo con los métodos descritos por BARKA y ANDERSON (1962) y PEARSE (1972) respectivamente. La mezcla de revelado para la APH contenía naftil AS BI fosfato (Sigma) en tampón veronal con pararosanilina y nitrito sódico a pH 5,0 (APENDICE 1). En el caso de la NSE la mezcla de revelado contenía  $\alpha$ -naftil acetato (Sigma) en tampón fosfato con pararosanilina y nitrito sódico a pH 6,5 (APENDICE 1). En ambos casos la reacción fue controlada bajo el microscopio de contraste de fases. Como control negativo se utilizaron frascos control donde se omitió la presencia del sustrato.

#### IIIe. Ensayos de fagocitosis.

La capacidad de fagocitosis se midió incubando los cultivos con levaduras (*Candida albicans*) inactivadas con calor (180°C durante 30 min.) y teñidas con una solución al 0,5% de rojo neutro en etanol al 96%, o con partículas de carbón (solución 1/300 de tinta china Pelikan 17 en medio RPMI-1640 con 10% de FCS). En ambos casos los frascos se mantuvieron a 37°C durante 1 hora.

IIIIf. Contajes de células positivas presentes en los cultivos primarios para los diferentes marcadores.

Se llevaron a cabo 50 cultivos diferentes de estroma tímico de rata y se realizaron contajes para cada marcador en 5 frascos diferentes correspondientes siempre a cultivos diferentes. Se contaron 50 células en cada caso.

Debido a que en ocasiones era difícil discernir si los tipos intermedios entre PTR, macrófagos de tipo 1 y 2 y células dendríticas lo eran realmente, no fueron tenidos en cuenta en los contajes y, por tanto, los porcentajes de células positivas son aproximados. En el caso de darse dos valores ambos representan el porcentaje máximo y mínimo encontrados en los 5 conteos.

#### IV. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION IN VITRO DE MACRÓFAGOS Y CELULAS DENDRÍTICAS DE TIMO DE RATA.

El aislamiento de los macrófagos y células dendríticas se llevó a cabo a partir de fragmentos de timos de ratas Wistar de 4 a 6 semanas de edad según el protocolo que se recoge en la FIGURA I utilizándose entre 6 y 8 ratas por aislamiento. Los fragmentos de timo se trataron con tripsina al 0,25% (Sigma) en RPMI-1640 suplementado con 10% de FCS durante 15 min. a 37°C y la suspensión celular se filtró a través de una malla de acero de 230  $\mu$ m de tamaño de poro (E-C apparatus, St. Petersburg, Fl). Posteriormente se obtuvo la fracción de células de baja densidad por centrifugación en un gradiente de Nycodenz de 1,068g/ml (Nycomed A.S., Oslo, Noruega) durante 10 min. a 850 g. incubándose durante 60 min. a 37°C en medio RPMI-1640 con 10% FCS en placas de Petri de 35 mm. Tras este período de incubación se eliminan los timocitos del sobrenadante por lavado permaneciendo las células dendríticas y los macrófagos adherentes en la superficie de cultivo. Posteriormente, los cultivos se mantuvieron durante 12 horas adicionales a 37°C tras las cuales las células dendríticas se despegan de la superficie de la placa y pueden ser recogidas del sobrenadante de cultivo (DC de día 1) mientras que los macrófagos se mantienen adheridos. Estos macrófagos (macrófagos de día 1) se pueden recuperar levantándolos del sustrato por incubación con una solución de tripsina (0,05%)-EDTA (0,02%) (Gibco Europe, Paisley, Escocia). En otros casos los macrófagos se mantuvieron en cultivo comenzando a proliferar activamente a partir de los 6 días. Entonces se vuelven mayoritariamente no adherentes y se pueden recoger fácilmente del sobrenadante del cultivo, lo que se hizo a 6, 10, 20 y 30 días de cultivo.

Para la caracterización fenotípica, 200 $\mu$ l/porta de la suspensión de células, a una concentración de 150.000 células/ml, se citocentrifugaron a 600 r.p.m. durante 10 min. en una citocentrífuga Cytospin 2 (Shandon, Chesire, U.K.).

De acuerdo con estos protocolos más del 95% de las células presentes en las citocentrifugaciones de macrófagos de día 1 y más del 98% de las presentes en citocentrifugaciones de macrófagos cultivados de más de 6 días estaban compuestas por macrófagos a juzgar por su morfología (ver apartado correspondiente de RESULTADOS) y su fuerte actividad APH y NSE. Por otro lado, a juzgar por su morfología (ver apartado correspondiente de RESULTADOS) y por su alta expresión de moléculas del MHC de clase II, más del 90% de las células presentes en las citocentrifugaciones de células dendríticas de día 1 eran células dendríticas.



IVa. Tratamiento de las células dendríticas aisladas y macrófagos cultivados con medio condicionado de esplenocitos activados con concanavalina A (Con A-SCM) e interleucina 2 recombinante (rIL-2).

Las células dendríticas aisladas de día 1 y los macrófagos cultivados de día 30 fueron tratados con 50 U/ml de rIL-2 humana (Sigma) o con 25% de Con A-SCM que contenía de 120 a 150 U/ml de IL-2, durante 72 horas (la IL-2 fue medida utilizando un ensayo biológico con la línea celular de ratón, CTL-2, dependiente de IL-2 (cedida por el Dr. A. Silva, CSIC, Madrid)).

#### IVa.1 Preparación del medio Con A-SCM.

Los esplenocitos de ratas Wistar de 4-6 semanas fueron cultivados (5 millones de células/ml) en medio RPMI-1640 con 10% FCS y 3 µg/ml de Con A (Sigma). Después de 2 días de cultivo se recogió el sobrenadante, se centrifugó a 850 g. durante 30 min., se filtró a través de un filtro de 0,22 µm de poro (Millipore, Bedford, Massachusetts) y se almacenó a -20°C.

IVb. Caracterización fenotípica de los marcadores de superficie y citoplásmicos y actividades enzimáticas de macrófagos y células dendríticas aisladas.

La caracterización fenotípica de estas células se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos descritos en los apartados IIIa. y IIIId. sobre citocentrifugaciones de DC de día 1, macrófagos de día 1 y macrófagos cultivados durante 6, 10, 20 y 30 días.

IVc. Contajes de células positivas en los aislamientos de macrófagos y células dendríticas.

Se llevaron a cabo 10 aislamientos y se contó el porcentaje de células positivas, independientemente de la intensidad de la tinción, para cada marcador y en cada período de aislamiento en 3 citocentrifugaciones diferentes correspondientes siempre a aislamientos diferentes. Se contaron 50 células por citocentrifugación.

Los porcentajes son aproximados debido a que, por un lado, como se comentó anteriormente, el enriquecimiento de ambos tipos celulares no fue del 100% y por otro algunas pocas células presentaban una morfología que difícilmente podía ser identificada claramente como perteneciente a un macrófago o una célula dendrítica.

En el caso en que se dan dos valores por marcador ambos representan el porcentaje máximo y mínimo encontrados en los tres conteos realizados.

#### V. CULTIVOS DE ESTROMA TIMICO TRATADOS CON 2'-DESOXIGUANOSINA (dGuo).

Los cultivos de estroma destinados a estudiar el efecto de la 2'-desoxiguanosina (dGuo, Sigma) fueron tratados desde su inicio con dGuo 0,5mM, 1,35mM, 2,5mM ó 4,0mM y permanecieron con la droga durante 2 semanas. En este caso se llevó a cabo la caracterización fenotípica de los tipos celulares presentes en estos cultivos de igual forma a como se realizó en los cultivos control: observación diaria con el microscopio de contraste de fases y análisis de los marcadores citoplásmicos y de superficie. En algunos cultivos la dGuo, en cualquiera de las concentraciones mencionadas, fue retirada al cabo de 5 días y en ellos se llevó a cabo la caracterización de los tipos celulares tal y como se ha descrito para los cultivos control.

En otra serie de experimentos se llevaron a cabo cultivos organotípicos de fragmentos de timo de ratas Wistar adultas. Para ello los timos de las ratas fueron cortados en pequeños fragmentos, lavados repetidamente y colocados sobre filtros Nucleopore de 0,8µm de tamaño de poro (Millipore Ibérica, Madrid) situados a su vez sobre una rejilla metálica de 60µm de tamaño de poro que servía de soporte del filtro. El filtro y la rejilla se situaban, a su vez, en placas Falcon (3037) de 60mm (Becton-Dickinson, Montview, CA) que se rellenaban con medio de cultivo control o suplementado con dGuo 1,35mM. El medio de cultivo era cambiado diariamente y los cultivos se mantuvieron durante 5 días. Posteriormente, los fragmentos fueron procesados para microscopía óptica como se describió en el apartado IIIC.

#### VI. TRASPLANTE DE LOS FRAGMENTOS TIMICOS CULTIVADOS ADHERIDOS AL SOPORTE DE CULTIVO (TABLA 2).

Las ratas se anestesiaron con una solución de pentobarbital sódico al 6% en etanol al 10% siendo la dosis utilizada de 4 mg/100g de peso del animal. Para llevar a cabo el trasplante se realizó una incisión dorsal quedando expuestos los dos riñones en los que se introdujeron 3 ó 4 fragmentos tímicos cultivados de 2-3 mm<sup>3</sup> debajo de cada cápsula renal. En una serie de experimentos (TABLA 2) los fragmentos de timo no cultivados de ratones C57, o cultivados durante 5 días en medio control (RPMI-1640 con 10% FCS) se trasplantaron en ratas eutímicas de las cepas Wistar ó AO y se extrajeron a los 4, 5, 7, 14 y 28 días; los no cultivados se trasplantaron en el riñón izquierdo y los cultivados en el derecho. En una segunda serie de experimentos se trasplantaron fragmentos de timos de ratas Wistar no cultivados o cultivados durante 5 días en medio control en ratas eutímicas de las cepas Wistar ó AO en combinación alogénica y se extrajeron a los 2, 4, 5, 7, 14, 21, 26, 28, 33 y 42 días; los no cultivados se trasplantaron en el riñón izquierdo y los cultivados en el derecho. Por último, también se trasplantaron fragmentos de timo de ratas Wistar cultivados durante 5 días en medio control o suplementado con

dGuo 1,35mM ó 4,0mM en ratas eutímicas de las cepas Wistar ó AO en combinación alogénica y se extrajeron a los 2, 4, 5, 7, 14, 21, 26, 28, 33 y 42 días; en el riñón izquierdo se trasplantaron fragmentos tratados con dGuo 1,35mM ó 4,0mM y en el derecho fragmentos cultivados en medio control.

Los animales trasplantados fueron sacrificados a distintos tiempos de supervivencia como se detalla en la TABLA 2 para su estudio morfológico. Para ello las áreas trasplantadas se diseccionaron, se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M a pH 7,4 durante toda la noche y se deshidrataron en acetona de grado creciente. Para la inclusión se trataron con una mezcla 1:1 de acetona:glicol-metacrilato (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 2 horas y posteriormente con glicol-metacrilato durante una noche. La polimerización se llevó a cabo con una mezcla de inclusión que contenía peróxido de benzoilo en glicol-metacrilato, polietilenglicol y N,N-dimetilanilina (APENDICE 1) a 4°C durante 4 horas y a continuación a temperatura ambiente durante una noche. Además, los trasplantes de fragmentos cultivados en medio control o suplementados con dGuo 1,35mM fueron extraídos después de 2, 5 y 21 días y fueron procesados para microscopía electrónica siguiendo el protocolo descrito en el apartado IIIc.

En una tercera serie de experimentos realizados en el Hospital Universitario de Utrecht se realizaron trasplantes de fragmentos cultivados en suspensión en combinaciones singénica y alogénica, tanto con ratas eutímicas como con ratas atímicas ("nude"). Las ratas atímicas, "nude", (RT1<sup>c</sup>) fueron obtenidas originalmente en el MRC Laboratory Centre (Carshalton, U.K.). El mutante recesivo es denominado rmu. Los machos homocigotos rmu/rmu fueron cruzados con hembras heterocigotas +/rmu y retrocruzadas con la cepa WAG/CBP (RT1<sup>u</sup>) durante 12 generaciones. Los animales fueron criados en condiciones libres de patógenos y mantenidos, después del destete, en cabinas de flujo laminar a 25°C. Se les suministró agua y lecho autoclavados y comida irradiada. Para realizar los trasplantes se utilizaron timos donantes de ratas WAG +/rmu (RT1<sup>u</sup>, combinación singénica) ó DA/Ola (RT1<sup>a</sup>, combinación alogénica) (Harlan/Olac, Zeist, Holanda).

#### VII. PREPARACION DE LOS FRAGMENTOS CULTIVADOS EN SUSPENSION.

Los timos fueron obtenidos de animales de 6 a 8 semanas de edad. Después de retirar la cápsula, el timo fue troceado en pequeños fragmentos de 2-3 mm<sup>3</sup> y cultivados en suspensión en medio RPMI-1640 (Gibco) con 20mM de tampón HEPES y suplementado con 22mM de bicarbonato sódico, 2mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y un 5% de FCS (Gibco) descomplementado a 57°C durante 30 min., e incubados a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Los fragmentos se colocaron en placas de 24 pocillos (Nunc/Delta, Gibco) y el medio fue cambiado diariamente. La

concentración de los suplementos de cultivo fue elegida de acuerdo con experimentos previos: 1,35mM, 2,5mM y 4,0mM de dGuo (Sigma)(JENKINSON y col., 1982; BUCKLEY y col., 1988); 1,0 µg/ml, 3,0 µg/ml y 10,0 µg/ml de ciclosporina A (CsA)(Sandoz, Basel, Suiza) (KOSUGI y col., 1984; KOSUGI y col., 1989; SCHUURMAN y col., 1990); 0,5 µg/ml, 5,0 µg/ml y 50,0 µg/ml de bis(tri-n-butiltín)óxido (TBTO) (M & T Chemicals Inc., Vlissingen, Holanda) (VOS y col., 1984). Estos componentes estuvieron presentes en el medio durante todo el período de cultivo que fue de cuatro, seis u ocho días. Los fragmentos cultivados durante ocho días se trasplantaron bajo la cápsula del riñón de ratas huésped bajo anestesia total. El número de ratas operadas siempre fue 1/3 del número de ratas que se utilizaron para la preparación de los fragmentos por lo que la cantidad de tejido trasplantado (entre 50 y 60 µg aproximadamente) en cada rata era el equivalente a los timos de tres donantes.

#### VIII. TRASPLANTE DE LOS FRAGMENTOS TIMICOS CULTIVADOS EN SUSPENSION (TABLA 3).

Se llevaron a cabo dos experimentos. El primero incluía 36 ratas WAG rnu/rnu de 6 a 8 semanas de edad que fueron divididas en tres grupos de 12 animales cada uno. Un grupo fue trasplantado con fragmentos preparados en presencia de 1,35mM de dGuo, otro grupo fue trasplantado con fragmentos preparados con 3,0 µg/ml de CsA y el tercero recibió fragmentos preparados en medio sin ningún suplemento (control). En cada grupo, 6 animales recibieron fragmentos singénicos y 6 recibieron fragmentos alogénicos. En cada subgrupo de 6 animales, 2 animales se sacrificaron 2 semanas después del trasplante, 2 a las 4 semanas y 2 a las 6 semanas. El segundo experimento incluyó 36 ratas eutímicas WAG +/rnu de 6 a 8 semanas de edad y se siguió el mismo diseño que para las ratas "nude" excepto el tiempo del sacrificio. Para animales trasplantados con fragmentos alogénicos se sacrificaron 2 animales en cada subgrupo de 6 animales una semana después del trasplante, 2 animales a las 2 semanas y 2 animales a las 3 semanas. Los huéspedes trasplantados con fragmentos singénicos fueron sacrificados después de 1 semana de trasplante (n=2), 2 semanas (n=2), 3 semanas (n=1) y 4 semanas (n=1). Además de los animales de los dos grupos experimentales, ratas WAG rnu/rnu y WAG +/rnu sirvieron como control.

#### IX. PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA HISTOLOGIA.

Algunos fragmentos cultivados fueron procesados para histología a los 4, 6 y 8 días de estar en cultivo: se fijaron en formol tamponado incluyéndose en parafina y obteniéndose a continuación cortes de 6 a 8 µm que fueron teñidos con hematoxilina durante 15 min. y eosina durante 1 min.

Por otro lado cuando los animales fueron sacrificados, el bazo, los ganglios linfáticos mesentéricos y parte de los CTF trasplantados fueron procesados para histología siguiendo el mismo protocolo mencionado.

#### X. PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA INMUNOHISTOQUIMICA.

Otra parte de los fragmentos fue congelada en N<sub>2</sub> líquido y conservada a -70°C para el estudio inmunohistoquímico. En este caso se fijaron cortes congelados de 6 a 8 µm en acetona a temperatura ambiente durante 10 min. lavándose a continuación con PBS. Se siguió un procedimiento con inmunoperoxidasa en tres pasos: el primero incluía el anticuerpo monoclonal (TABLA 1) que se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora; en el segundo se incubaron Ig de conejo anti-Ig de ratón (Dako) a una dilución 1/100 durante 30 min. y en el tercero Ig de cerdo anti-Ig de conejo (Dako) a una dilución 1/100 durante 30 min., ambos conjugados con peroxidasa.

Para los anticuerpos policlonales se usó un segundo paso con Ig de cabra anti-Ig de conejo biotinadas (Vector) 1/250 durante 20 min. seguido de una incubación con complejos avidina-biotina (kit de Vector). La actividad peroxidasa fue desarrollada con DAB al igual que lo descrito en el apartado IIIId. En este caso la señal fue aumentada añadiendo sulfato de níquelamonio al 2,5% durante la reacción. Los cortes fueron contrastados con rojo nuclear y los controles negativos incluían la omisión del primer anticuerpo o sustitución por un anticuerpo irrelevante. En esta situación no se observó tinción excepto el correspondiente a la peroxidasa endógena presente en los granulocitos polimorfonucleares.

#### XI. PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Una pequeña parte del fragmento trasplantado fue fijada en glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 2% en cacodilato 0,1M, lavado en tampón cacodilato 0,2M con sacarosa al 1% a pH 7,3, posfijada en de tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato 0,1M e incluida en Epon 812 siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito. Los cortes se obtuvieron en un ultramicrotomo Ultracut-E (Reichert-Jung) y para su estudio a microscopía óptica los cortes semifinos (1 µm) se tiñeron con una solución básica de azul de toluidina al 1%.

## XII. APENDICE 1. COMPOSICION DE LOS REACTIVOS

### FIJADOR PLPG:

Solución A: lisina tamponada (300 ml)

a)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1M:

2,13 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

150 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

b) Lisina 0,2M:

5,75 g de lisina monoclórida

150 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

Mezclar a + b y ajustar el pH a 7,4

Solución B: glutaraldehído/paraformaldehído (100ml)

a) 4 g de paraformaldehído

90 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  a 60°C.

b) 8 ml de glutaraldehído al 25%

Mezclar las soluciones A + B y añadir periodato de lisina en las siguientes relaciones:

8,5 mg de periodato sódico por cada 3 vol. de A + 1 vol. de B.

TAMPON CACODILATO 0,1M (100ml):

1,07 g de Cacodilato sódico

en 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

TAMPON FOSFATO 0,1M (100ml):

1,42 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0,27 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada a pH 7,4

TAMPON MILLONIG II (100ml):

0,2 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

1,3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

2,8 g de Sacarosa

en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada a pH 7,3

TAMPON PBS 10X (1 litro):

3,56 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

11,92 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

ajustar a pH 7,2

87,76 g de  $\text{NaCl}$

en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

MEZCLA DE REACCION DE LA DAB (100ml):

50 mg de DAB\*

$\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,01%

en PBS a pH 7,2.

(\*) Sigma

MEZCLA DE REACCION DEL AEC (100ml):

25 mg de AEC\*

$\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,01%

en acetato sódico 100mM a pH 5,2

(\*) kit de Vector

TINCION DE LAS REJILLAS CON CITRATO DE PLOMO:

Disolver 1,33 g de nitrato de plomo en 30ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y hervida y 1,76 g de citrato sódico

Completar hasta 50ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y filtrar

MEDIO DE INCUBACION PARA LA NSE:

Solución A:

2,5 mg de  $\alpha$ -naftil acetato en 250  $\mu\text{l}$  de acetona

7,5 ml de tampón fosfato 0,2M

2,5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

Solución B:

0,5 ml de pararosanilina al 4% en  $\text{HCl}$  2N

0,5 ml de nitrito sódico al 4% en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

Se mezclan ambas soluciones y se ajusta a pH 6,5

MEDIO DE INCUBACION PARA LA APH:

Solución A:

10 mg de naftil AS-BI fosfato en 1 ml de N,N-dimetil formamida

5 ml de tampón veronal\*

12 ml de H<sub>2</sub>O destilada

Solución B:

0,5 ml de pararosanilina al 4% en HCl 2N

0,5 ml de nitrito sódico al 4% en H<sub>2</sub>O destilada

Se mezclan ambas soluciones y se ajusta a pH 5,0

\* Tampón veronal:

9,7 g de acetato sódico

14,7 g de barbiturato sódico

en 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada

MEZCLA DE INCLUSION DEL METACRILATO:

10 ml de glicol-metacrilato

0,06 g de peróxido de benzoilo

0,25 ml de PEG 400/NNDA\*\*

\*\* mezcla 30:1 de polietilenglicol 400/N,N-dimetilanilina



## **RESULTADOS**

## 1. CARACTERIZACION DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE ESTROMA TIMICO DE RATA.

### 1a. Establecimiento del cultivo.

El establecimiento de los cultivos primarios de estroma tímico de rata era consecuencia de la proliferación celular de los diferentes componentes que formaban los fragmentos tímicos que se siembran en los frascos de cultivo. Aunque entre distintos fragmentos había variaciones tanto en el índice de proliferación de los diferentes tipos celulares como en su organización histológica, el establecimiento y desarrollo de los cultivos seguía una directriz común que puede definirse por la aparición secuencial de los diferentes tipos celulares que aparecerán en los cultivos y la formación de núcleos de proliferación definidos. Por tanto, es a partir de los fragmentos adheridos al soporte de cultivo desde donde, a partir del segundo día de cultivo, se podía observar el inicio de la proliferación celular (Fig. 1). A partir de estos núcleos principales los fibroblastos empezaban a proliferar alrededor de los fragmentos. También desde el segundo o tercer día se podían observar grupos de células redondeadas, muy refringentes, netamente mayores en tamaño que los timocitos y que proliferaban activamente. Estas células habían sido descritas anteriormente en cultivos de estroma tímico de ratón y designadas como células fagocíticas del retículo tímico (PTR) (PAPIERNIK y col., 1983), término que nosotros también utilizaremos.

Después de tres ó cuatro días de cultivo se observaron zonas separadas de los fragmentos formadas por fibroblastos y PTR que constituían núcleos de proliferación secundarios con una capacidad proliferativa comparable a la de los fragmentos tímicos originales (Fig. 2). Mientras el cultivo se desarrollaba se podía observar que los fibroblastos iban formando en algunas áreas una monocapa celular que se iba extendiendo gradual y radialmente alrededor de los fragmentos, si bien en otras zonas del cultivo la proliferación no era tan activa y los fibroblastos no llegaban a formar una monocapa.

Después de la primera semana comenzaban a proliferar las células epiteliales que generalmente constituían una monocapa alrededor de los fragmentos (Fig. 3) pero que también podían formar pequeños grupos aislados, mostrando en este caso baja capacidad proliferativa. Además, en zonas libres donde los fibroblastos no habían constituido una monocapa se observaban macrófagos adherentes que nunca llegaban a formar colonias bien definidas. Denominaremos a estas células macrófagos tipo 1 (Fig. 4) para diferenciarlas de los macrófagos de tipo 2 que se encontraban en zonas fibroblásticas. También después de 6-8 días los cultivos mostraban células dendríticas tanto en zonas libres como en zonas fibroblásticas que frecuentemente aparecían asociadas a células de aspecto linfoide (Fig. 5).

A pesar del reiterado lavado a que son sometidos los fragmentos antes de ser cultivados, durante las primeras fases del cultivo, principalmente en la primera semana, se observaban numerosos linfocitos en el sobrenadante de los cultivos, muchos de los cuales parecían blastos. Generalmente, después de 10-12 días la mayoría de las células linfoides que se observaban en el cultivo presentan un aspecto picnótico y muchas de ellas habían sido fagocitadas por las PTR. No obstante en algunas ocasiones era posible observar linfocitos viables hasta después de 15 días de cultivo. En los frascos en los que la totalidad de los linfocitos había desaparecido, podía observarse un reinicio de la proliferación linfoide después de dos semanas, apareciendo grupos de linfocitos, entre los que había numerosos linfoblastos, en la proximidad de los fragmentos (Fig. 6).

#### Ib. Tipos celulares presentes en los cultivos primarios.

Los tipos celulares observados en los cultivos primarios de estroma tímico de rata eran fibroblastos, PTR, células epiteliales, macrófagos de tipo 1 y 2 y células dendríticas. Las características inmunohistoquímicas de estas células están resumidas en la TABLA 4.

##### Ib.1 Fibroblastos.

Los fibroblastos eran las primeras células que proliferaban a partir de los fragmentos ya desde el segundo día de cultivo (Fig. 1) constituyendo un grupo celular muy heterogéneo tanto por su tamaño, variable entre 75  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ , como por su capacidad proliferativa. Así, se podían distinguir fibroblastos fusiformes, alargados y con una alta capacidad proliferativa, fibroblastos poligonales irregulares con un citoplasma muy extendido y baja capacidad proliferativa y, por último, fibroblastos estrellados también irregulares con largas prolongaciones citoplásmicas y que, al igual que los poligonales, mostraban una baja capacidad proliferativa (Fig. 7).

Durante las primeras fases del cultivo los fibroblastos que proliferaban alrededor de los fragmentos eran generalmente de tipo fusiforme y, a medida que se desarrollaba el cultivo, aparecían los fibroblastos poligonales y los estrellados. Las monocapas de fibroblastos estaban formadas sólo por fibroblastos fusiformes y nunca por fibroblastos poligonales o estrellados. Además, los fibroblastos se localizaban frecuentemente en asociación con núcleos de proliferación de PTR (Fig. 2) y limitando colonias de células epiteliales.

Los fibroblastos eran células muy adherentes con un citoesqueleto constituido de filamentos de vimentina que desde el núcleo irradiaban por todo el citoplasma formando una red

tridimensional (Fig. 7). Expresaban ligeramente moléculas del MHC de clase I (Fig. 8) pero no de clase II, ni poseían actividad fagocítica, ni actividades enzimáticas fosfatasa ácida o esterasa inespecífica.

#### Ib.2 Células Epiteliales.

Las células epiteliales se podían observar generalmente después de la primera semana de cultivo formando colonias que proliferaban a partir de los fragmentos (Figs. 3, 9). Dentro de la colonia (FIGURA II) se podían distinguir células con diferente morfología que mostraban distinto grado de proliferación y adherencia y variaban en la expresión de diferentes marcadores. El área central de la colonia estaba ocupada por células poligonales (Fig.II,1), adherentes, con un tamaño entre 40  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , con nucléolos patentes y en muchas ocasiones binucleadas y que crecían en estrecho contacto unas con otras formando una monocapa epitelial pavimentosa (Fig. 10). Por el contrario, en las zonas de la periferia de la colonia la morfología, adherencia y grado de proliferación eran más variables quizás debido a la presencia de fibroblastos que limitaban el crecimiento de la colonia. En estas zonas donde los fibroblastos fusiformes limitaban el crecimiento de las células epiteliales éstas presentaban la misma morfología poligonal que aquellas situadas en el centro de la colonia, pero a medida que transcurría el tiempo de cultivo algunas de las células epiteliales más periféricas podían presentar un aspecto degenerado (Figs.II,2 y 10).

En las zonas no limitadas por fibroblastos había áreas donde las células epiteliales presentaban una morfología poligonal (Fig. II,3), eran adherentes y mostraban un bajo índice de proliferación (Fig. 11), mientras que en otras las células aparecían redondeadas o alargadas (Fig. II,4), refringentes, semiadherentes, con un tamaño menor al descrito para las anteriores variable entre 20  $\mu\text{m}$  y 40  $\mu\text{m}$  y con gran capacidad proliferativa (Fig. 12). Estas últimas se iban haciendo adherentes y adquirían una morfología poligonal a medida que transcurría el tiempo. Estas zonas (Fig. II,5) también podían observarse ocasionalmente en el interior de las colonias (Fig. 13). Dentro de las colonias de células epiteliales no se distinguían otros tipos celulares excepto algunos fibroblastos dispersos, de forma que no se observaron en ningún momento interacciones en el cultivo entre células epiteliales y linfoides (Figs. 10, 11).

Las células epiteliales poseían un citoesqueleto constituido por filamentos de queratina (Fig. 14) que se organizaba de manera distinta dependiendo de la morfología de la célula: en las células adherentes poligonales se disponían de forma radial desde el núcleo hacia la periferia de la célula, mientras que en las redondeadas se concentraban alrededor de la zona nuclear.

Independientemente de la morfología que presentara la célula, la tinción con el anticuerpo anti-citoqueratina era variable, de forma que se observaban células intensa, mediana y débilmente teñidas. Cuando la colonia de células epiteliales era todavía incipiente y estaba constituida por pocas células, algunas de ellas de morfología redondeada, semiadherentes y de tamaño pequeño (entre 10  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ ) la tinción con anti-citoqueratina era fuerte.

La expresión de moléculas del MHC de clase I de las células epiteliales era alta independientemente de su morfología (Fig. 9) y la expresión de moléculas del MHC de clase II era variable dependiendo del grado de adherencia y la actividad proliferativa de las células: en las células poligonales y adherentes era baja, mientras que en las redondeadas semiadherentes situadas en las áreas de proliferación es más intensa (Fig. 12).

Las células epiteliales no mostraban capacidad fagocítica ni actividad fosfatasa ácida o esterasa inespecífica.

### Ib.3 PTR.

Las PTR eran células redondeadas, muy refringentes cuando se observaban bajo microscopía de contraste de fases, con un tamaño comprendido entre 15  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figs. 1, 2, 6) que poseían un núcleo redondeado u ovalado y un citoplasma ocupado por numerosas vesículas y fagosomas de desarrollo variable. El citoesqueleto de las PTR estaba constituido por filamentos intermedios de vimentina dispuestos radialmente desde el centro celular. Estas células expresaban fuertemente moléculas del MHC de clase I (Fig. 8) y, en la primera semana de cultivo, alrededor de un 50% de ellas expresaban también moléculas del MHC de clase II (Fig. 15). Este porcentaje disminuía a medida que transcurría el tiempo de cultivo y tras 4 semanas el número de PTR MHC clase II<sup>+</sup> era inferior a un 10% (Fig. 16). El estudio de los cultivos incluidos en Epon reveló que la tinción para moléculas del MHC de clase II no estaba restringido a la membrana plasmática de las PTR sino que también se localizaba en vesículas intracitoplásmicas (Fig. 17).

Aproximadamente un 50% de las PTR se teñían tanto superficial como intracitoplásmicamente con los anticuerpos ED1 y ED2 (Figs. 18, 19). Entre un 30% y un 50% expresaban además la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) reconocida por el anticuerpo monoclonal OX-39 (Hüning y col., 1989) (Fig. 20), y entre un 50% y un 70% se teñían con el anticuerpo OX-42 (Fig. 21).

En los ensayos de fagocitosis se observó, aunque no se realizó un análisis cuantitativo, que la cantidad de material fagocitado dependía del grado de adherencia que mostraban las PTR. El

número de partículas de carbón (Fig. 22) y de levaduras fagocitadas (Fig. 23) era mayor en las PTR pequeñas redondeadas no adherentes que en las semiadherentes. Además todas las PTR mostraban actividad fosfatasa ácida (Fig. 24) y esterasa inespecífica, aunque estas enzimas presentan una distribución diferente: mientras que la esterasa inespecífica se localizaba tanto en membrana como en vesículas citoplásmicas (Fig. 25), la fosfatasa ácida aparecía exclusivamente en vesículas citoplásmicas (Fig. 24).

Estas células no eran adherentes y proliferaban rápidamente desde los primeros días de cultivo (Fig. 26) localizándose, inicialmente, en grupos cercanos a los fragmentos llegando a constituir grandes colonias asociadas con fibroblastos. A medida que el cultivo se desarrollaba, podían establecer colonias independientes de los fragmentos tímicos originales. En este caso siempre estaban asociadas a fibroblastos: desde algunos fibroblastos poligonales o estrellados dispersos hasta monocapas de fibroblastos fusiformes. En la primera semana de cultivo, durante la cual se producía una importante proliferación linfoide, se podían observar asociaciones entre PTR y linfocitos (Fig. 27). Las PTR que formaban estos complejos eran siempre redondeadas y con un tamaño homogéneo entre 15  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ . El número de linfocitos que se asociaban a ellas variaba pudiendo alcanzar hasta 20 por PTR.

Como ya se comentó anteriormente la proliferación linfoide disminuía a medida que transcurría el tiempo de cultivo a la vez que aumentaba progresivamente el número de células linfoides muertas. Estas eran fagocitadas activamente por las PTR en cuyo citoplasma aparecían numerosos linfocitos (Fig. 25). La mayoría de estos linfocitos presentaba aspecto picnótico si bien, en ocasiones y en bajo número, también se observaron linfocitos vivos. En esta situación, dado el número de células fagocitadas, así como la cantidad de fagolisosomas presentes en su citoplasma, las PTR podían alcanzar un tamaño de 75-90  $\mu\text{m}$ .

En este mismo sentido las PTR podían presentar durante las primeras fases de cultivo una morfología distinta a la descrita al comienzo de este apartado debido a la fagocitosis masiva de células linfoides muertas. Por otra parte, en cualquier fase del cultivo una pequeña proporción de ellas se adhería a la superficie del cultivo aunque tras 9-15 días proliferaban de nuevo rápidamente recobrando la mayor parte de ellas su morfología característica, es decir, células no adherentes, redondeadas con escasos fagolisosomas y un tamaño entre 15  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$  (Fig. 2).

#### Ib.4 Macrófagos tipo 1.

Definimos estas células como los macrófagos adherentes que se podían observar a partir de los 4-5 días de cultivo en áreas libres de fibroblastos (Figs. 4, 24). Mostraban una forma irregular con un citoplasma muy extendido, un tamaño de entre 50  $\mu\text{m}$  y 140  $\mu\text{m}$ , y numerosas vesículas citoplásmicas y gránulos perinucleares (Fig. 28). Los macrófagos tipo 1 no formaban colonias sino que aparecían dispersos sobre la superficie del cultivo entre células fibroblásticas y, en algunos casos, en las fases iniciales del cultivo donde hay numerosos linfocitos, podían establecer contactos de superficie con ellos.

Su citoesqueleto estaba organizado por filamentos de vimentina que se disponían radialmente desde el núcleo hasta la periferia (Fig. 7). Estas células expresaban moléculas del MHC de clase I (Fig. 28) pero generalmente no de clase II. No obstante, en algunas ocasiones podía verse una tinción citoplásmica para estas moléculas asociado siempre con vesículas citoplásmicas.

Al igual que las PTR, aproximadamente un 50% de los macrófagos de tipo 1, presentaban una tinción en la membrana y en vesículas citoplásmicas con los anticuerpos ED1 y ED2 (Fig. 29), pero no expresaban ni la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) ni se tiñeron con el anticuerpo OX-42. Además tenían una baja actividad fosfatasa ácida y esterasa inespecífica (Fig. 24) por lo que exhibían una baja capacidad fagocítica.

#### Ib.5 Macrófagos tipo 2.

Denominamos así a macrófagos adherentes situados en áreas previamente colonizadas por fibroblastos que podían observarse en los cultivos a partir de los 5-8 días. Mostraban forma irregular con numerosas vesículas y gránulos citoplásmicos, y un tamaño entre 50  $\mu\text{m}$  y 140  $\mu\text{m}$  (Fig. 30). Los macrófagos tipo 2 no formaban tampoco colonias sino que aparecían dispersos sobre la monocapa de fibroblastos sin establecer contactos con linfocitos.

Poseían un citoesqueleto formado por filamentos de vimentina, expresaban moléculas del MHC de clase I pero, generalmente, no expresaban MHC de clase II (Fig. 15) si bien en algunas células podía apreciarse tinción en vesículas citoplásmicas. Al igual que las PTR y los macrófagos tipo 1 aproximadamente el 50% de los macrófagos de tipo 2 eran positivos para los anticuerpos ED1 y ED2 (Fig. 30), tanto en la membrana como en vesículas citoplásmicas, no expresaban IL-2R $\alpha$  ni se tiñeron con el anticuerpo OX-42 y mostraban una baja actividad enzimática fosfatasa ácida y esterasa inespecífica.

En los cultivos se observaron células cuyas características morfológicas y fenotípicas indicaban una condición intermedia entre PTR y macrófagos de tipo 1 (Fig. 31) y de tipo 2 (Fig. 32) lo que sugiere que estas últimas células podrían provenir de PTR que tras adherirse al sustrato perderían la expresión de ciertos marcadores como MHC de clase II, IL-2R $\alpha$  y OX-42 reduciéndose además su capacidad proliferativa y su actividad enzimática tanto para fosfatasa ácida como para esterasa inespecífica y, por consiguiente, su capacidad fagocítica.

#### Ib.6 Células dendríticas.

Las células dendríticas aparecían después de la primera semana de cultivo tanto en zonas de fibroblastos como en áreas libres, caracterizándose por tener prolongaciones citoplásmicas largas y estrechas y un tamaño variable entre 40  $\mu$ m y 200  $\mu$ m (Fig. 5). Estas células tenían un núcleo situado excéntricamente, generalmente con indentaciones características y pequeños gránulos perinucleares (Fig. 17). Las células dendríticas interaccionaban con linfocitos estableciendo complejos celulares en los que el número de linfocitos podía ser incluso superior a 20 por complejo. Algunos de estos linfocitos presentes en los complejos expresaban moléculas del MHC de clase II en su membrana (Fig. 5).

Las células dendríticas no reaccionaban con el anticuerpo anti-citoqueratina ni con el anticuerpo monoclonal anti-vimentina. Mostraban de forma característica una alta expresión de moléculas del MHC de clase I y II (Fig. 5) pero no expresaban IL-2R $\alpha$  ni OX-42, eran negativas para ED1 y ED2 y mostraban una débil actividad enzimática tanto para fosfatasa ácida como para esterasa inespecífica, restringida a la zona perinuclear.

Pese a que estas características sugerían que no poseían actividad fagocítica, en algunas imágenes células de aspecto dendrítico con una alta expresión de MHC de clase II mostraban en su citoplasma material fagocitado (Fig. 33).

#### Ic. Ultraestructura de los tipos celulares.

El análisis ultraestructural confirmó la presencia de los tipos celulares ya descritos que aparecen en los cultivos primarios de estroma tímico de rata, fibroblastos, células epiteliales, PTR, macrófagos y células dendríticas. Además, como ya hemos mencionado repetidamente los cultivos contenían también células linfoides de diferentes tamaños cuya ultraestructura era absolutamente igual a la observada in situ en el timo (Fig. 34).



Las células epiteliales tendían a formar grupos en los cultivos, unidas mediante desmosomas y presentando una forma poligonal con prolongaciones más o menos aplanadas donde se observaban haces de filamentos. En su citoplasma también aparecían cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER), cuerpos multivesiculares e inclusiones de naturaleza lipídica (Fig. 34).

Los típicos fibroblastos de forma alargada, densos a los electrones y con cisternas dilatadas de RER aparecían en áreas donde abundaban las fibras de colágena (Fig. 35).

Las denominadas PTR (Figs. 36, 37) eran células redondeadas, polarizadas, con numerosas vellosidades cortas proyectadas desde la superficie celular, que mostraban actividad esterasa inespecífica (Fig. 36) pero que no expresaban, al menos en un 50% de la población, moléculas del MHC de clase II (Fig. 37). Lo más llamativo de estas células eran los componentes membranosos de su citoplasma consistentes de numerosos cuerpos densos, gotas lipídicas de densidad electrónica variable, figuras de mielina y pequeños gránulos densos (Fig. 36) y grandes vacuolas vacías (Fig. 37), que por un lado demostraban la capacidad fagocítica de estas células y, por otro, el alto nivel de recambio de su membrana.

Los macrófagos que también mostraban una fuerte actividad esterasa inespecífica asociada a la membrana plasmática presentaban igualmente abundantes restos degenerados en su citoplasma, incluyendo células completas (Fig. 38).

La extrema irregularidad de sus prolongaciones celulares y la fuerte expresión de moléculas del MHC de clase II caracterizaban la ultraestructura de las células dendríticas presentes en los cultivos (Fig. 39). Además, un núcleo irregular con poca cromatina condensada, algunas vesículas claras y pequeños gránulos densos a los electrones definían este tipo celular a nivel ultraestructural (Fig. 39).

#### Id. Evolución temporal de los cultivos.

Como señalamos anteriormente, el establecimiento de los cultivos primarios de estroma a partir de los fragmentos tímicos originales implica la aparición secuencial de los distintos tipos celulares que los constituyen. Además hemos observado que cada una de estas poblaciones celulares tiene características diferenciales en lo que se refiere a su organización estructural, a su relación con otras poblaciones y a su capacidad proliferativa. Atendiendo a todas estas propiedades hemos observado que a lo largo del tiempo la evolución de los cultivos determina unas

fases de desarrollo caracterizadas por procesos definidos (FIGURA III): una primera fase desde el inicio del cultivo hasta el día 4, una segunda entre los días 5 y 8 y una tercera entre los días 9 y 15. A continuación describimos las características de los cultivos en cada momento lo que permite definir cada una de sus fases de desarrollo.

0-4 días de cultivo (FIGURA IIIa):

- \* rápido desarrollo de los fibroblastos a partir de los fragmentos cultivados que constituyen los núcleos primarios de proliferación de linfocitos entre los que se distinguen numerosos blastos, en la proximidad de los fragmentos (Fig. 1).

- \* proliferación de PTR no adherentes en asociación con fibroblastos (Figs. 1, 2, 24). Los linfocitos degenerados son activamente fagocitados por las PTR (Fig. 25).

- \* aparición de los macrófagos tipo 1 en áreas libres de fibroblastos (Fig. 28).

5-8 días de cultivo (FIGURA IIIb):

- \* proliferación de las células epiteliales que forman colonias delimitadas en parte por fibroblastos (Figs. 3, 9, 10, 11, 12).

- \* incremento en la proliferación de los fibroblastos que ocupan gran parte de la superficie del cultivo.

- \* disminución de la proliferación linfoide que se manifiesta por la ausencia de linfoblastos a la vez que se observan un gran número de linfocitos muertos.

- \* activa proliferación de PTR.

- \* aparición de los macrófagos de tipo 2 en áreas de fibroblastos (Fig. 30).

- \* aparición de células dendríticas tanto en zonas libres como sobre monocapas de fibroblastos (Fig. 5).

9-15 días de cultivo (FIGURA IIIc):

- \* incremento en la proliferación de las células epiteliales (Fig. 14).

- \* reinicio de la proliferación linfoide que se manifiesta por la aparición de núcleos celulares proliferativos con numerosos linfoblastos (Fig. 6).

- \* proliferación de PTR que forman colonias en relación con fibroblastos, constituyendo núcleos de proliferación secundarios (Fig. 2).

Por último señalaremos que en cultivos que mantuvimos durante largos períodos de tiempo (1 mes o más) se daban dos situaciones diferentes: mientras que en algunos casos las células del cultivo acababan presentando un aspecto degenerado y necrótico que refleja una interrupción de la

proliferación celular, en otros se observaba una proliferación continuada de las PTR siempre en asociación con fibroblastos. En este último caso el resto del cultivo lo formaban células fibroblásticas entre las que se podían observar macrófagos tipo 1 y 2.

## II. CARACTERIZACION IN VITRO DE MACROFAGOS Y CELULAS DENDRITICAS TIMICAS.

### IIa. Macrófagos.

Después de su aislamiento (día 1) los macrófagos mostraban una forma redondeada, un núcleo ovalado y pequeñas vesículas citoplásmicas además de algunos fagolisosomas de mayor tamaño (Fig. 40).

Después de 6 días de cultivo los macrófagos empezaban a proliferar activamente y la mayoría de ellos se volvían no adherentes. Estos macrófagos cultivados presentaban las mismas características morfológicas que las descritas anteriormente para los macrófagos aislados de día 1 con un mayor desarrollo de las vesículas citoplásmicas e iguales características a las descritas para las PTR de los cultivos primarios.

El análisis fenotípico de los macrófagos se llevó a cabo después de su aislamiento (día 1) y entre los 6 y 30 días de cultivo (TABLA 5 y FIGURA IV). Los macrófagos de día 1 expresaban moléculas del MHC de clase I y II, Thy-1, CD4, la molécula detectada por OX-44, eran positivas para el anticuerpo OX-42 (Fig. 41), en su mayoría eran ED1<sup>+</sup> (Fig. 42) pero sólo aproximadamente el 50% expresaban ED2. Además poseían actividad enzimática APH y NSE pero no exhibían actividad peroxidasa. Por otro lado no expresaban la cadena  $\alpha$  del IL-2R ni el antígeno de activación detectado por el anticuerpo monoclonal OX-48.

Mientras que la expresión de algunos marcadores como MHC de clase I, IL-2R, CD4, la molécula detectada por OX-44, ED1 y ED2 no sufrían importantes variaciones cuando se mantienen los macrófagos en cultivo (TABLA 5 y FIGURA IV), la expresión de moléculas del MHC de clase II y Thy-1 disminuía progresivamente (de un 50-60% a día 1 hasta un 10-20% a día 30), y al contrario, se producía un aumento del número de células positivas para OX-42 (de un 60-70% a un 100%) y para OX-48 (de un 0% a un 100%).

En la TABLA 6 por otro lado se muestra el efecto del tratamiento de los cultivos de macrófagos de día 30 con IL-2 recombinante (rIL-2) y medio condicionado de esplenocitos cultivados con Con A (Con A-SCM). El tratamiento con rIL-2 producía un aumento del número de células positivas para moléculas del MHC de clase II (Figs. 43, 44) e inducía la expresión del

IL-2R de manera que el número de células OX-39<sup>+</sup> pasaba de un 0% a un 80-100% (Fig. 45), pero no afectaba a la expresión de Thy-1. Por otra parte, el tratamiento con Con A-SCM inducía también un aumento del número de células que expresaban tanto moléculas del MHC de clase II como Thy-1 y, en menor medida, IL-2R (Figs. 46, 47).

#### I Ib. Células dendríticas.

Las células dendríticas aisladas de día 1 presentaban una morfología estrellada con largas y delgadas prolongaciones citoplásmicas, un núcleo indentado situado excéntricamente y pequeños gránulos citoplásmicos perinucleares (Fig. 48). A diferencia de los macrófagos, las células dendríticas no proliferaban en cultivo y terminaban muriendo después de 5 ó 7 días.

El análisis fenotípico de las células dendríticas (TABLA 7) se realizó después de su aislamiento (día 1) y demostró que estas células expresaban moléculas del MHC de clase I y II (Fig. 49), Thy-1 (Fig. 50), OX-42, OX-44 y OX-48. Por otro lado poseían una actividad enzimática APH y NSE débil restringida al área perinuclear, eran negativas para los anticuerpos ED1 y ED2 y no expresaban IL-2R. El tratamiento de las células dendríticas aisladas (día 1) con rIL-2 y Con A-SCM durante 48 horas no produjo variaciones en la tinción con OX-42 ni indujo la expresión de la cadena  $\alpha$  del IL-2R.

### III. CARACTERIZACION DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE ESTROMA TIMICO TRATADOS CON DESOXIGUANOSINA (dGuo).

Al igual que comentábamos para los cultivos primarios de estroma que se prepararon en medio control (RPMI-1640 con 10% de FCS), en los cultivos tratados con dGuo se apreciaron variaciones entre distintos fragmentos que afectaron tanto a la proliferación de los diferentes tipos celulares como a la organización de los propios fragmentos pero también se observaron algunos patrones de desarrollo comunes. Así, durante las primeras fases del cultivo (hasta 5 días) siempre fue posible distinguir, con cualquiera de las concentraciones utilizadas (1,0mM, 1,35mM, 2,5mM y 4,0mM), la presencia de todos los tipos celulares descritos en los cultivos control aunque el desarrollo de los mismos fue considerablemente menor. El área ocupada por la monocapa de células era mucho más pequeña que la ocupada, en iguales períodos de tiempo, por los cultivos control. Un hecho común, en cualquier caso, fue la presencia de un elevado número de linfocitos picnóticos, incluso después de 2 ó 3 días de cultivo.

Dentro de esta cierta variabilidad encontrada lo que resultó evidente es que la proliferación celular era menor en los tratados con 2,5mM de dGuo que la de los tratados con

1,0mM ó 1,35mM; además, en los tratados con 4,0mM la monocapa apenas se había desarrollado alrededor de los fragmentos incluso una semana después de iniciado el cultivo. Por último, no observamos grandes diferencias entre los tratados con 1,0mM ó 1,35mM de dGuo.

En los cultivos en los que la droga fue retirada a los 5 días se observó un inicio de la proliferación de todos los tipos celulares. Esta proliferación fue baja para PTR, macrófagos y células epiteliales y especialmente alta en fibroblastos que terminaban por colonizar toda la superficie del cultivo 4 ó 5 días después de ser retirada la dGuo.

Lo más destacado en los cultivos que permanecieron con la droga durante todo el período de estudio (2 semanas) era que, pese a que se observaron PTR, macrófagos y células epiteliales generalmente cercanas a los fragmentos, las células que más activamente se desarrollaron fueron los fibroblastos. Las PTR formaron en algunas zonas pequeños núcleos de proliferación en relación con fibroblastos y, como en los cultivos control, también se observaron macrófagos tipo 1 y 2. Las células epiteliales formaron colonias pequeñas a partir de los fragmentos siempre rodeadas por fibroblastos.

En los primeros 5 días de cultivo en presencia de la droga siempre se observaron células pequeñas, redondeadas que mostraban una alta expresión de moléculas del MHC de clase II (Fig. 51). Además, en cultivos en los que la droga estuvo presente más de una semana aparecían células con una morfología típicamente dendrítica similares a las descritas en los cultivos control. Por otro lado no observamos que las características fenotípicas de las células de los cultivos tratados variasen respecto a las ya descritas de los cultivos control (Figs. 52, 53).

#### IV. MORFOLOGIA DE LOS FRAGMENTOS CULTIVADOS.

Como ya se mencionó en el apartado de MATERIALES Y METODOS la técnica de cultivo utilizada para preparar los fragmentos en los trasplantes con ratas alogénicas en nuestro laboratorio fue diferente a la que usamos para los trasplantes con ratas "nude" y eutímicas en el Hospital Universitario de Utrecht y por ello consideramos oportuno describir por separado ambos tipos de fragmentos. Además, en el caso de los fragmentos cultivados durante 5 días adheridos al frasco de cultivo tratados con dGuo, sólo describiremos los cultivados con 1,35mM ya que fueron éstos los que se utilizaron para realizar posteriormente los trasplantes.

IVa. Morfología de los fragmentos control y tratados con 1,35mM de dGuo, cultivados durante 5 días adheridos al frasco de cultivo.

Pese a la variabilidad en el contenido celular que se encontró entre los fragmentos estudiados era posible definir un patrón morfológico que no difería notoriamente entre los cultivados en medio control y los cultivados con 1,35mM de dGuo.

En general los fragmentos cultivados en medio control presentaban un contenido celular básicamente compuesto por fibroblastos y algunos macrófagos dispuestos entre masas de colágeno y poca cantidad de epitelio (Fig. 54). Por el contrario, los tratados con 1,35mM de dGuo contenían un mayor número de células epiteliales que se situaban en el borde del fragmento (Figs. 55). Estas eran aplanadas, fuertemente queratinizadas en algunas ocasiones y rodeaban parcialmente al fragmento pudiendo disponerse formando capas o incluso en algunas zonas en estructuras concéntricas donde las células estaban muy empaquetadas. En algunas zonas el epitelio limitante del fragmento se proyecta hacia el interior del mismo mediante células epiteliales alargadas e irregulares (Fig. 56).

El único aspecto en que ambos tipos de fragmentos variaron ostensiblemente era en la masiva muerte celular encontrada en los fragmentos cultivados con dGuo principalmente debida a linfocitos (Figs. 55, 56). En muchas ocasiones se observaron zonas limitadas completamente por células epiteliales que contenían numerosos linfocitos picnóticos pero también células no linfoides grandes con citoplasma claro, con núcleo ovalado y que no presentaban un aspecto picnótico (Fig. 56).

Por último comentaremos que en algunas áreas se observaron células de aspecto macrofágico con gran cantidad de material fagocitado que recordaban morfológicamente a las PTR observadas en los cultivos (Fig. 56). En estas mismas zonas se observaron blastos y células de aspecto linfóide no picnóticas. También encontramos, ocasionalmente, células grandes irregulares, con citoplasma pálido y excéntrico que recordaban a células interdigitantes (IDC). Dichas células aparecían tanto alrededor de los fragmentos (Fig. 57) como en el interior (Fig. 58) y lo mismo en los fragmentos control (Fig. 57) como en los cultivados con dGuo (Fig. 58). Por último, ocasionalmente aparecían células aisladas de aspecto monocítico en los bordes de los fragmentos (Fig. 59) o en el interior del fragmento en contacto con otras células de aspecto epitelial o interdigitante (Fig. 60).

La microscopía electrónica confirmó, en términos generales, la organización de los fragmentos ya observada a microscopía óptica no apreciándose diferencias significativas entre los fragmentos control y aquellos tratados con dGuo, salvo la mayor muerte celular observada en estos últimos y respecto al predominio, en ambos casos, del componente epitelial. Sin embargo, no se pudo confirmar desde el punto de vista ultraestructural la existencia de células interdigitantes sugerida por algunas imágenes obtenidas a microscopía óptica. Describiremos consiguientemente ambos resultados juntos.

La parte más externa de los fragmentos estaba cubierta por varias capas de células epiteliales aplanadas (Figs. 61, 62) asociadas más o menos íntimamente entre sí por desmosomas incipientes (Fig. 63). Estas células parecían hallarse en distintos estadios de maduración, si bien siempre se trataba de elementos metabólicamente muy activos con grandes nucléolos, densidad electrónica alta o moderada y abundantes orgánulos citoplásmicos entre los que destacaban numerosos perfiles de retículo endoplásmico rugoso (RER) que frecuentemente aparecían con las cisternas dilatadas mostrando un contenido moderadamente denso a los electrones y gránulos redondeados, grandes y muy densos (Figs. 61, 62). Mitochondrias pequeñas, vesículas de pinocitosis, algunas vacuolas o restos membranosos degenerados y abundantes polirribosomas completaban la ultraestructura de estas células (Figs. 61, 62).

En algunas zonas de la periferia de los fragmentos las células epiteliales aparecían igualmente asociadas entre sí y mantenían las características descritas de células activas con elevada densidad electrónica, gránulos citoplásmicos densos a los electrones y cisternas dilatadas de RER, si bien aquí mostraban formas irregulares con numerosas prolongaciones y, a veces, abundantes restos fagocitados en su citoplasma (Fig. 64). Por último, en la proximidad de las capas periféricas epiteliales que limitaban los fragmentos aparecían elementos libres más o menos irregulares que, si bien en algunos casos podrían representar células fagocíticas (Fig. 65) como habíamos apuntado a microscopía óptica, en otros casos podrían ser células epiteliales (Figs. 66, 67), que establecían incipientes contactos con las células próximas (Fig. 66) y mostraban ciertas características primitivas, tales como abundantes mitochondrias, un aparato de Golgi bien desarrollado y masas de filamentos citoplásmicos (Fig. 67). Algunas de estas células se observaron en división (Fig. 68).

El interior de los fragmentos estaba ocupado por restos de linfocitos y otros tipos celulares (Figs. 69, 70) que eran especialmente abundantes en los fragmentos tratados con dGuo (Fig. 70) donde los restos de cromatina llegaban a fusionarse en grandes masas (Fig. 71). Además,

se observaban grandes células epiteliales con aspecto aparentemente degeneradas, con el citoplasma fragmentado en numerosas vesículas membranosas y ocupado por abundante glucógeno y grandes gránulos redondeados con un contenido de densidad electrónica media (Fig. 72). Tales células mantenían, no obstante, fragmentos dilatados de RER (Figs. 72, 73), gránulos densos a los electrones y tonofilamentos (Fig. 74), como las células que hemos descrito en las periferia de los fragmentos y algunas de cuyas prolongaciones se localizan en la parte central entre estos elementos degenerados (Fig. 73). Por último, también aparecían en el interior macrófagos similares a los descritos alrededor de los fragmentos, cargados de restos fagocitados (Fig. 75).

IVb. Morfología de los fragmentos control y tratados con dGuo, ciclosporina A (CsA) o bis(tri-n-butiltín)óxido (TBTO), cultivados en suspensión.

Después de 4 ó 6 días de cultivo en muchos de los fragmentos todavía se observaban grandes áreas llenas de linfocitos, la mayoría con aspecto picnótico y algunas zonas diferenciadas de epitelio (Fig. 76). En algunos era posible distinguir áreas que recordaban las características que in situ presentan la corteza y médula tímica (Fig. 77). También era posible observar áreas de células epiteliales, con núcleos grandes y ovales, así como células grandes con vesículas y linfocitos fagocitados en su citoplasma.

Después de 8 días de cultivo los fragmentos consistían principalmente de una matriz de colágeno, en el que se distinguían numerosas células epiteliales dispuestas tanto en grupos compactos como rodeando parcial o totalmente el fragmento (Fig. 78). En ocasiones se observaron grupos de células de aspecto linfóide y en estos casos la mayoría de ellas presentaba un aspecto picnótico (Fig. 79). También se distinguían restos de vasos sanguíneos y células endoteliales.

No encontramos notorias diferencias morfológicas, en los días mencionados, entre los fragmentos cultivados en medio control o con 1,35mM de dGuo o 3,0 µg/ml de CsA (Figs. 80, 81, 82). Por el contrario, tanto en los fragmentos cultivados en presencia de 4,0mM de dGuo como los cultivados con 10 µg/ml de CsA mostraban áreas muy pequeñas de células epiteliales y numerosas zonas con abundantes linfocitos picnóticos (Fig. 83). Además, en todas las concentraciones utilizadas de TBTO la mayoría de los fragmentos presentaban células con núcleos picnóticos (Fig. 84) y únicamente en algunos de los tratados con la dosis menor (0,5 µg/ml) se observaron pequeñas áreas con células epiteliales.

Confirmamos la presencia de células epiteliales tanto en los fragmentos control como en los tratados utilizando anticuerpos dirigidos contra queratina (Figs. 85, 86, 87), contra células



epiteliales corticales en rata (His-38\*) (Figs. 88, 89, 90) y contra células epiteliales subcapsulares y medulares en rata (His-39\*) (Figs. 91, 92, 93). El número de células teñidas con His-39 fue menor que las teñidas con queratina y His-38 tiñó incluso menor número de células que el anticuerpo anti-citoqueratina y His-39.

También se confirmó la presencia de macrófagos mediante los anticuerpos ED1 (Figs. 94, 95, 96) y ED2 (Figs. 97, 98, 99). Debido a que los fragmentos cultivados son un tejido muy poco compacto, la arquitectura de los mismos se ve muy alterada cuando se realizan los cortes en congelación afectándose igualmente la morfología de las células. Por tanto para algunos de los marcadores utilizados era difícil asignar un claro patrón de distribución; este es el caso de la expresión de moléculas del MHC de clase I (OX-18) (Figs. 100, 101, 102) y II (ER-13) (Figs. 103, 104, 105) lo cual no permitió asegurar que los patrones encontrados en los fragmentos fuesen equivalente a los que estos anticuerpos dan in situ en el timo normal de rata. Sin embargo, la expresión en algunas zonas de moléculas de MHC de clase II era mayor que la correspondiente a células teñidas para queratina más ED (Figs. 104, 105) sugiriendo la posibilidad de que en los fragmentos existían células dendríticas como ya apuntábamos en el análisis histológico de los fragmentos cultivados adheridos al frasco de cultivo. Los datos inmunohistoquímicos obtenidos fueron similares para los fragmentos cultivados en medio control, y para aquellos cultivados con 1,35mM de dGuo o con 3,0 µg/ml de CsA.

#### V. CARACTERISTICAS DE LOS FRAGMENTOS, CULTIVADOS DURANTE 5 DIAS ADHERIDOS AL SOPORTE DE CULTIVO, TRASPLANTADOS EN RATAS EUTIMICAS ALOGENICAS.

Cuando los trasplantes fueron diseccionados dentro de las 2 primeras semanas, siempre fue posible localizar macroscópicamente el área donde se había realizado el trasplante. Sin embargo, a las 3 semanas fue muy difícil su localización y después de 1 mes o más apenas se distinguía la zona donde se había realizado la incisión.

Para tener una idea inicial de cuál era la histología y el comportamiento de los trasplantes bajo la cápsula del riñón realizamos una serie de experimentos en los que cultivamos fragmentos de timo de rata y ratón adheridos al frasco de cultivo, y los trasplantamos en ratas eutímicas de las cepas Wistar y AO. Asimismo, realizamos trasplantes con fragmentos de timo no cultivados de rata y ratón trasplantados en ratas de las mismas cepas (ver TABLA 2 y el apartado VI de MATERIALES Y METODOS).

Va. Fragmentos de timo cultivados y no cultivados de ratón trasplantados en rata.

Va.1 Trasplante de fragmentos no cultivados.

A los 4 días del trasplante los fragmentos no cultivados de ratón de la cepa C57 presentaban un aspecto fibroso con grupos de linfocitos situados preferentemente en el borde entre injerto y riñón pero también en todo el tejido trasplantado. Muchas de las células que se distinguían en este tipo de trasplantes tenían aspecto fibroblástico (Fig. 106). En ningún caso se observó una organización histológica similar a la del timo. A los 7 días la parte más externa del injerto presentaba un aspecto fibroso y todavía se distinguían áreas con linfocitos y macrófagos en zonas más profundas. A las 2 semanas el área del trasplante era muy pequeña comparada con la que se trasplantó y el tejido contenía mayoritariamente células linfoides y macrófagos además de numerosos vasos sanguíneos de gran calibre. Por último cabe señalar que en cualquiera de los casos nunca se distinguieron los injertos después de 3 o más semanas.

Va.2 Trasplante de fragmentos cultivados.

El tejido cultivado de ratón, trasplantado en rata, presentaba un aspecto muy diferente al del tejido no cultivado. Mientras que éste apenas era distinguible a los 4 días y casi inapreciable al cabo de una o dos semanas, los trasplantes de tejido cultivado en medio control mostraban un aspecto muy abultado en la primera semana después del trasplante; la histología de los trasplantes después de 4 días mostró que el tejido conjuntivo, células fibroblásticas y, sobre todo, linfocitos eran mucho más abundantes que en el tejido fresco (Fig. 107).

En cualquiera de los casos, al cabo de un mes el tejido de ratón cultivado trasplantado apenas era visible macroscópica e histológicamente se observó la desaparición del injerto. La mayor parte del implante en este momento consistía de una matriz de colágeno con fibroblastos y algunos, aunque pocos en número, vasos sanguíneos. Igualmente todavía era posible distinguir grupos de linfocitos y macrófagos infiltrados en el tejido (Fig. 108).

Vb. Fragmentos de timo cultivados y no cultivados de rata trasplantados en rata.

Vb.1 Trasplantes de fragmentos no cultivados.

Al igual que lo descrito para el caso del timo no cultivado de ratón, los fragmentos de timo no cultivado de rata trasplantados bajo la cápsula renal extraídos a los 4 días consistían de un tejido fibroso en el que se podían distinguir numerosos linfocitos, macrófagos y vasos sanguíneos y, en algunos casos, grupos compactos de células epiteliales que mostraban cierto grado de queratinización (Fig. 109).

## Vb.2 Trasplante de fragmentos cultivados.

En los experimentos en los que trasplantamos fragmentos cultivados en medio control en un riñón y tratados con dGuo 1,35mM en el otro, analizamos la morfología de los fragmentos a microscopía óptica después de 2, 5, 21 y 45 días después del trasplante y a microscopía electrónica a 2, 5 y 21 días. En ambos casos, los fragmentos presentaban en general un aspecto muy similar, por lo que se describirán conjuntamente en el texto.

### Vb.2.1 Dos y cinco días después del trasplante.

A los 2 días del trasplante se podían distinguir en los fragmentos control, especialmente en el borde entre los túbulos renales y el tejido trasplantado, masas compactas de células que recordaban un parénquima tímico, es decir, numerosos linfocitos situados entre células no linfoides grandes, redondeadas con prolongaciones citoplásmicas y aspecto epitelial (Fig. 110). En el caso de los fragmentos tratados con dGuo el grado de organización era menor y el trasplante consistía de un estroma laxo de células epiteliales con abundantes zonas vacías (Fig. 111). En ambos casos la zona intermedia situada entre el borde descrito anteriormente y la cápsula renal contenía abundantes fibroblastos, macrófagos y vasos sanguíneos (Fig. 112). A los 5 días se podían distinguir en el tejido trasplantado tres zonas bien diferenciadas (Figs. 113, 114): en la parte más externa del injerto se observaban varias capas de células epiteliales y fibroblastos aplanadas que se extendían por la mayoría del área ocupada por el trasplante. Una zona intermedia formada mayoritariamente por un tejido conectivo laxo (Figs. 113, 114) con abundante material extracelular en el que se observaron linfocitos dispersos, numerosos vasos sanguíneos algunos de los cuales tenían gran calibre, y en el que la mayoría de las células eran alargadas bipolares con características típicas de fibroblastos (Figs. 115, 116). No obstante, algunas de las células que se encontraban en esta zona eran de tamaño grande, tenían un núcleo oval con un nucléolo patente recordando las características que presentan las células epiteliales. En la parte más interna, cercana a los túbulos renales, se podía observar un tejido compacto formado por numerosos linfocitos y células no linfoides (Figs. 113, 114). Entre éstas se podían observar algunas de posible naturaleza epitelial de tamaño grande con el núcleo claro, cromatina condensada en un ribete perinuclear y un nucléolo patente (Fig. 117) y otras, también de tamaño grande, que poseían un citoplasma claro con núcleo dentado que podían corresponder a células interdigitantes (Fig. 118). En este período no observamos diferencias ni en los tipos celulares ni en la organización morfológica de estas tres áreas entre ratas trasplantadas con fragmentos control o tratados con dGuo (Comparar las Figs. 113, 115, 117, sin dGuo y las Figs. 114, 116, 118, con dGuo).

Como ya describíamos a microscopía óptica la evolución de los fragmentos trasplantados fué semejante tanto en los fragmentos control como en los tratados con dGuo, si bien, en los primeros la reorganización histológica del epitelio tímico fué más rápida que en los segundos. Así, 2 días después del trasplante, en los fragmentos control, podíamos distinguir en la zona más externa del fragmento, la más alejada de los túbulos renales, elementos epiteliales muy primitivos. Por el contrario, en la zona más interna, la más cercana a los túbulos renales, ya existía un estroma epitelial compacto donde se podían distinguir distintos tipos de células epiteliales. Hay que señalar, no obstante, que como ya mencionamos en el estudio histológico, la variabilidad entre fragmentos era grande y en algunos injertos predominaban los elementos epiteliales primitivos mientras que en otros ya se manifestaba cierta heterogeneidad estructural consecuencia de la maduración de los mismos.

Dos días después del trasplante bajo la cápsula renal los fragmentos control se organizaban en su parte más externa en capas de células aplanadas epiteliales de aspecto primitivo entre masas de colágena. Estas células eran poco densas a los electrones con núcleos más o menos irregulares que mostraban escasa cromatina condensada y abundantes ribosomas libres en el citoplasma (Fig. 119). Junto a ellos se observaban algunas mitocondrias y, en algunos casos, fragmentos de retículo endoplásmico y pequeños gránulos alargados o redondeados con un contenido denso a los electrones. En estas células era difícil observar tonofilamentos citoplásmicos y sólo se establecían incipientes contactos superficiales entre unas células y otras.

Por debajo de esta capa superficial, los elementos epiteliales se disponían de una manera mucho más laxa (Fig. 120) en una región donde se observaban granulocitos heterófilos y había una clara neoformación vascular. Las células epiteliales mantenían las características descritas pero ahora mostraban forma redondeada y en su superficie aparecían numerosos pliegues con los que interaccionaban con las células próximas (Fig. 120). En esta zona, se observaban, a veces, células con el RER muy desarrollado con cisternas dilatadas y grandes gránulos redondeados densos a los electrones, que recordaban a las observadas en los fragmentos cultivados antes de ser trasplantados (Fig. 121).

Finalmente en la parte más profunda del injerto, en la proximidad de los túbulos renales, los elementos epiteliales tímicos constituían un estroma mucho más compacto donde ya se apreciaba cierta heterogeneidad estructural (Fig. 122). Así, junto a elementos alargados con RER dilatado y gránulos densos a los electrones, como los ya descritos, aparecían numerosas células muy poco

densas a los electrones cuyos orgánulos citoplásmicos tendían a disponerse en la proximidad al núcleo, dejando libre el citoplasma periférico (Fig. 123). Estas células, que en algunos aspectos recuerdan a las células interdigitantes tímicas in situ en el parénquima tímico, mostraban desmosomas que confirmaban su naturaleza epitelial además de una población de orgánulos citoplásmicos donde predominaban ribosomas dispersos, mitocondrias alargadas, aparato de Golgi bien desarrollado, algunos tonofilamentos, vesículas lisas y pequeños gránulos (Figs. 123, 124). En otros casos el predominio correspondía a cisternas alargadas de RER (Fig. 124) y, generalmente, la densidad electrónica aumentaba ligeramente (Fig. 123). Posiblemente estas dos células correspondan al mismo tipo celular en diferentes estados de activación.

Entre la masa de células epiteliales electrolúcidas aparecían, a veces, elementos irregulares muy densos a los electrones (Figs. 125, 126) que mostraban cisternas irregulares y muy dilatadas de RER y abundantes polirribosomas. Estas células aparecían frecuentemente asociadas a la lámina basal de los túbulos renales o a las paredes vasculares (Figs. 125, 126) y recordaban estructuralmente a las denominadas células barrera descritas in situ en el timo y los órganos linfoides periféricos de rata y ratón (WEISS, 1991).

A los 5 días de ser trasplantados los fragmentos control se habían convertido en una masa epitelial compacta entre las que se podían distinguir linfocitos medianos y grandes (Fig. 127). Las células epiteliales aparecían densas a los electrones, alargadas o con largas prolongaciones citoplásmicas (Figs. 127, 128) y algunas de ellas desarrollaban quistes intracitoplásmicos (Fig. 129). Continuaban observándose algunas células barrera (Fig. 130) y, excepcionalmente, aparecían células cuya ultraestructura recordaba a la de las IDC, especialmente por los numerosos plegamientos que mostraba su membrana plasmática con los que contactaba con las células próximas, y por el desarrollo de vesículas de REL (Fig. 131). Aunque en estas células no se observaron microfilamentos ni desmosomas, tampoco identificamos gránulos de Birbeck y, por tanto, no podemos descartar que se trate realmente de células epiteliales. Por último también observamos entre las células epiteliales, células fagocíticas con abundantes restos en su citoplasma (Fig. 132).

Como ya señalábamos, el desarrollo de los fragmentos tratados con dGuo, tras su trasplante in vivo bajo la cápsula renal, fué más lento que el caso de los fragmentos control. A los dos días, el fragmento consistía de células muy primitivas con núcleos voluminosos que contenían escasa cromatina condensada y nucléolos grandes. En el citoplasma apenas se identificaban orgánulos membranosos y predominaban los ribosomas libres y algunos grandes muy

electrodensos (Fig. 133). En algunas células más diferenciadas ya se observaban cortos fragmentos de RER, algunos haces de microfilamentos e incipientes desmosomas que conectaban unas células con otras (Fig. 134). Aunque era frecuente observar estas células en división (Fig. 134) los espacios intercelulares eran mucho mayores que en el caso de los fragmentos control y aquí no se observaron células epiteliales organizadas en capas periféricas. En la zona más profunda del fragmento, en la proximidad de los túbulos renales, se observaron algunas células más diferenciadas, densas a los electrones, con abundantes mitocondrias, un Golgi muy desarrollado y algunos gránulos pequeños, similares a las observadas en los fragmentos control, aunque permanecen los grandes espacios extracelulares llenos de fibras conectivas y sustancia fundamental (Fig. 135).

A los 5 días, ya se podía observar también aquí, capas periféricas de células epiteliales aplanadas (Fig. 136), como habíamos observado, a los dos días, en los fragmentos control. También ahora se observaron en la zona intermedia, donde abundan los vasos sanguíneos, células epiteliales redondeadas (Fig. 137) con cortas prolongaciones celulares que establecen incipientes uniones desmosómicas entre sí (Fig. 138). En el interior de los vasos sanguíneos se observaban, por otra parte, células de aspecto monocítico con prolongaciones irregulares, una abundante población granular y algunos polirribosomas (Fig. 139). En las zonas más próximas a los túbulos renales ya se había constituido masas de células epiteliales, algunas de ellas pálidas y de aspecto primitivo, y algunas células con pequeños gránulos citoplásmicos (Fig. 140), pero también elementos más diferenciados con largos perfiles de RER, un Golgi bien organizado y numerosas mitocondrias (Fig. 141). También en esta zona era frecuente encontrar células epiteliales en división (Fig. 142) y ocasionalmente se observaron grupos de células epiteliales que constituían estructuras muy similares a los corpúsculos de Hassall del parénquima tímico (Fig. 143). En estas áreas las células estaban íntimamente unidas entre sí mediante numerosas interdigitaciones de la membrana plasmática y desmosomas bien desarrollados (Figs. 143, 144). Algunas células de la pared del corpúsculo aparecían en división sugiriendo que se trataba de una estructura en formación (Fig. 144) y, tanto entre las células como en la luz del corpúsculo, había depósitos amorfos densos a los electrones (Fig. 145). Por último, como en los fragmentos control, había células barrera íntimamente asociadas a las paredes de los vasos sanguíneos (Fig. 146).

#### Vb.2.2 Tres, cuatro y seis semanas después del trasplante.

Tres semanas después del trasplante no fue posible diferenciar la organización morfológica descrita en días anteriores ni en las ratas trasplantadas con fragmentos control (Fig. 147) ni en las que recibieron fragmentos tratados con dGuo (Fig. 148) de manera que en

ambos casos el componente epitelial había desaparecido por completo. El área del trasplante se limitaba, macroscópicamente, a una superficie de menos de medio milímetro cuadrado y a microscopía óptica se observaba la presencia de un tejido fibroso infiltrado por algunos linfocitos y unos pocos capilares sanguíneos.

Como ya se había observado a microscopía óptica, en los estadíos siguientes analizados el aspecto de los fragmentos trasplantados cambió radicalmente tanto en los fragmentos control como en los tratados con dGuo. El estudio ultraestructural a los 21 días confirmó la desaparición de las masas epiteliales quedando solamente grupos de células linfoides entre las que se distinguían tanto linfoblastos como linfocitos de tamaño medio y pequeños linfocitos densos a los electrones (Figs. 149, 150). En estas áreas aparecían asimismo macrófagos cargados de numerosos restos celulares (Fig. 151) y, ocasionalmente, se observaron algunas células plasmáticas maduras repletas de RER con cisternas dilatadas (Fig. 152).

La situación no varió después de cuatro semanas (Fig. 153) y después de seis semanas en muchos casos no fue posible localizar la zona del trasplante, distinguiéndose sólo en algunos una pequeñísima zona que a microscopía óptica presentaba similares características a las descritas a tres y cuatro semanas pero que ocupaba una superficie menor, no encontrándose además diferencias entre trasplantes control y tratados con dGuo (Fig. 154). Tanto después de tres como de cuatro y seis semanas el tejido trasplantado había desaparecido y los túbulos renales ocupaban sus restos.

En algunos experimentos en los que trasplantamos fragmentos control y tratados con dGuo 4,0mM (TABLA 2) observamos que después de una semana, en ambas situaciones, los injertos presentaban ya un aspecto degenerado ocupando un área muy reducida y estaban formados casi exclusivamente por linfocitos y tejido conectivo (Fig. 155). Después de un mes no se encontraron restos de los fragmentos trasplantados.

Finalmente comentaremos que, aunque el número de trasplantes llevados a cabo en ratas de la cepa AO fue menor que los realizados en ratas de la cepa Wistar, no observamos diferencias entre ambas cepas.

VI. CARACTERISTICAS DE LOS FRAGMENTOS CULTIVADOS DURANTE 8 DIAS EN SUSPENSION, TRASPLANTADOS EN RATAS "NUDE" Y EUTIMICAS EN COMBINACIONES SINGENICA Y ALOGENICA.

VIa. Ratas "nude".

En todos los casos excepto en uno los fragmentos trasplantados fueron localizados macroscópicamente con independencia del tiempo pasado desde que se realizó el trasplante. El estudio histológico de los fragmentos demostró que entre el injerto y el tejido renal siempre había un límite claro, es decir, no se encontró tejido trasplantado en las zonas más externas del riñón. A lo largo del período de estudio (6 semanas) se comprobó que los fragmentos recuperaban la citoarquitectura que presentan los lóbulos tímicos en una rata normal con una clara distinción entre áreas corticales y medulares. Dos semanas después del trasplante los fragmentos consistían en una matriz de colágeno, en la que, generalmente, no se observaron linfocitos, y en la que se podían distinguir células epiteliales formando bandas o grupos compactos que no mostraban una determinada distribución dentro del trasplante (Figs. 156, 157, 158). Nuevamente no se observaron diferencias sustanciales entre los fragmentos controles y los tratados tanto con dGuo como con CsA.

A las 4 semanas la histología fue similar en cuanto al tejido conjuntivo y las células epiteliales pero, además, se podían distinguir una masiva colonización linfoide dispuestos en las zonas ocupadas por células epiteliales (Figs. 159, 160, 161). Además, el tejido conectivo que rodeaba las zonas de células epiteliales apenas contenía linfocitos.

A las 6 semanas del trasplante la histología de las zonas pobladas de linfocitos mostraban una clara distinción corteza-médula y con una distribución similar a la que se puede observar en el timo normal de rata (Figs. 162, 163, 164). Estos lóbulos estaban separados por zonas de tejido conjuntivo que podían ocupar una extensión variable y que siempre contenían linfocitos.

No encontramos diferencias sustanciales en la histología de los trasplantes entre ratas trasplantadas con fragmentos cultivados en medio control o tratados con 1,35mM de dGuo o 3,0µg/ml de CsA.

El análisis inmunohistoquímico utilizando el anticuerpo policlonal anti-citoqueratina confirmó la naturaleza epitelial de las bandas de tejido que aparecían entre las masas de colágeno 2 y 4 semanas después del trasplante (Fig. 165). Estas células también expresaban moléculas del MHC de clase II del haplotipo donante (Figs. 166, 167). El patrón de tinción para



His-39 fue completamente similar al de queratina (Figs. 168, 169) y sólo unas pocas células en las bandas se tiñeron intensamente con His-38 siendo la tinción del resto débil (Fig. 170).

Las áreas de células epiteliales en trasplantes de 4 semanas empezaban a mostrar, además del patrón descrito anteriormente, un patrón reticular para queratina (Figs. 171, 172) y para MHC de clase II (Figs. 173, 174, 175), similar a los que se observan in situ para estos anticuerpos en la corteza de los lóbulos del timo normal de rata. En los trasplantes estudiados después de 6 semanas, los patrones de queratina (Fig. 176) y moléculas de MHC clase II (Fig. 177) se asemejan ya a los que se observan in situ en la corteza y médula tímicas, es decir, un patrón reticular en las áreas corticales y células grandes, irregulares en las medulares.

El patrón de expresión in situ de citoqueratina en la zona subcapsular de un timo de rata normal (continuo formando una banda compacta) sólo se observó en algunos de los lóbulos del trasplante mientras que en la mayoría el borde más externo no presentaba un límite continuo. En este caso el patrón reticular de queratina de las zonas corticales externas estaba en contacto directo con las zonas de tejido conjuntivo que rodeaba los lóbulos epiteliales (Fig. 178).

El patrón de tinción para His-39 en trasplantes de 6 semanas (Figs. 179, 180, 181) también fue similar al detectado en timo normal: células epiteliales subcapsulares de la corteza y células de forma estrellada, poligonal u ovalada con grandes proyecciones citoplásmicas en la médula. Por el contrario, el número de células positivas para His-38, que en zonas corticales de timo normal de rata tiñe células epiteliales con un patrón reticular, fue muy bajo (Figs. 182, 183).

La naturaleza de los linfocitos presentes en los fragmentos tímicos trasplantados fue analizada en las distintas combinaciones estudiadas a 4 semanas (Figs. 184, 185, 186, 187, 188) y 6 semanas (Figs. 189, 190, 191, 192) después del trasplante utilizándose anticuerpos monoclonales anti-CD5 (Figs. 185, 189), anti-TcR  $\alpha\beta$  (Figs. 186, 190), anti-CD8 (Figs. 187, 191) y anti-CD4 (Figs. 188, 192).

A las 6 semanas la expresión de CD5 y TcR  $\alpha\beta$  era débil en las zonas corticales y fuerte en las medulares (Figs. 189, 190), mientras que a 4 semanas se observaron células con distinta intensidad de tinción para ambos marcadores (Figs. 185, 186). Con respecto a los marcadores CD8 (células OK-8<sup>+</sup>) y CD4 (células ER2<sup>+</sup>), aparecían células positivas para ambos marcadores en las zonas corticales a 6 semanas (Figs. 191, 192) y en la zona epitelial colonizada a 4 semanas

(Figs. 187, 188). Además, en las áreas medulares de los fragmentos trasplantados a 6 semanas aparecían células ER-2 positivas intensamente teñidas (Fig. 192) y, en menor número, células OX-8 positivas (Fig. 191) con un patrón de tinción similar al que se observa in situ para estos dos marcadores.

A las 2 semanas del trasplante los macrófagos ED1<sup>+</sup> y ED2<sup>+</sup> tiñeron células en el tejido conectivo que rodeaba las bandas de células epiteliales pero nunca dentro de ellas (Fig. 193). A las 6 semanas, por el contrario, la distribución de los macrófagos era igual a la que se observa in situ en un timo de rata normal: células ED1<sup>+</sup> tanto en la corteza como en la médula (Figs. 194, 195, 196) mientras que los ED2<sup>+</sup> se localizaban exclusivamente en corteza (Fig. 197).

Nuevamente no encontramos grandes diferencias en la tinción de los marcadores comentados entre ratas trasplantadas con fragmentos control o tratado con dGuo o CsA.

Para analizar la procedencia de las células presentes en los trasplantes utilizamos anticuerpos que distinguían el haplotipo del huésped y el del donante. El anticuerpo monoclonal F17-23-2 reconoce moléculas del MHC de clase II de los haplotipos RT1<sup>a</sup>, RT1<sup>n</sup> y RT1<sup>l</sup> siendo RT1<sup>a</sup> el haplotipo de las ratas DA donantes. A las 2 semanas el anticuerpo F17-23-2 tiñó las células epiteliales dispuestas en grupos compactos en el tejido trasplantado y después de 4 y 6 semanas aparecía un patrón reticular típico in situ del componente epitelial en la corteza tímica (Fig. 177).

El anticuerpo OX-3 reconoce moléculas del MHC de clase II de los haplotipos RT1<sup>n</sup> y RT1<sup>l</sup> siendo RT1<sup>n</sup> el haplotipo presente en las ratas WAG huéspedes. A las 2 semanas se observaban algunas células positivas para el anticuerpo OX-3 que rodeaban las bandas de tejido epitelial y, ocasionalmente, dentro de las bandas de células epiteliales (Fig. 198). También a las 4 semanas esta tinción específica del huésped se observaba en zonas epiteliales colonizadas por linfocitos y a las 6 semanas la distribución del marcador coincidía básicamente con las zonas de médula observada en los fragmentos trasplantados (Fig. 199). Además existía tinción de células aisladas en las zonas corticales que presentaban un patrón muy similar al ya descrito para macrófagos ED1<sup>+</sup> y ED2<sup>+</sup> en estas mismas zonas.

Respecto a las moléculas del MHC de clase I, el anticuerpo U9-F4-B1, que reconoce moléculas del haplotipo del huésped (RT1<sup>n</sup>), teñía los elementos del tejido conectivo del fragmento trasplantado así como todas las células linfoides que lo invadían pero no las bandas

epiteliales (Fig. 200). Estas células sí se tiñeron, sin embargo, con el anticuerpo OK-18 que reconoce un determinante monomórfico en las moléculas del MHC de clase I (Fig. 201).

Al igual que lo ya comentado para la histología y para el fenotipo de los linfocitos no encontramos llamativas diferencias entre ratas trasplantadas con fragmentos que fueron cultivados en medio control o tratados con dGuo o CsA.

#### VIb. Histología del bazo y ganglios linfáticos de las ratas "nude" trasplantadas.

Después de 2 y 4 semanas de realizados los trasplantes, las vainas linfoides periarteriolas (PALS) del bazo (Figs. 202, 203) y el paracortex en los ganglios linfáticos (Figs. 204, 205) de las ratas "nude" trasplantadas estaban aun completamente vacías de linfocitos y sólo se pudieron observar algunos linfocitos dispersos en estas áreas después de 6 semanas (Figs. 206, 207). Además, en algunos casos se observaron centros germinales en los ganglios linfáticos a las 6 semanas.

Como en el caso de los fragmentos ya comentado no había variaciones importantes en el comportamiento descrito entre ratas trasplantadas con fragmentos cultivados en medio control o cultivados con dGuo o CsA ni entre ratas trasplantadas con fragmentos alogénicos o singénicos.

#### VIc. Ratas eutímicas.

##### VIc.1 Combinación singénica.

En fragmentos extraídos 1, 2 y 3 semanas después del trasplante se podían distinguir bandas de células epiteliales (Figs. 208, 209, 210), similares a las descritas en los trasplantes en ratas "nude", junto a una masiva presencia de células linfoides y una cantidad de tejido conectivo muy superior al encontrado en las ratas "nude" (Figs. 211, 212, 213, 214). Si bien el número de linfocitos en todo el trasplante era muy grande también podían observarse linfocitos dentro de las bandas de células epiteliales.

El número de linfocitos aumentó, en general, en todo el área del trasplante, pero también en áreas de células epiteliales, 2, 3 y 4 semanas después del trasplante siendo abundantes en grandes vasos situados en el borde entre el riñón y el trasplante (Fig. 215). Este desarrollo de los vasos fue menor a las 2 semanas y estuvo casi ausente 1 semana después del trasplante (Fig. 216). También en el tejido conjuntivo se observaban macrófagos ED1 y ED2 positivos durante todo el período de estudio (Figs. 217, 218).

Sóamente después de 4 semanas se comenzó a observar que las células epiteliales, detectadas con el anticuerpo anti-citoqueratina (Fig. 219), adquirían el mismo aspecto reticular que el descrito para las ratas "nude" a las 4 semanas del trasplante. Igualmente, la distribución de células linfoides dentro de las bandas de células epiteliales y la expresión de moléculas del MHC de clase I y II eran similares a lo observado en las ratas "nude".

Al igual que en los animales atímicos no encontramos diferencias entre ratas trasplantadas con fragmentos cultivados en medio control o tratados con dGuo o CsA.

#### Vic.2 Combinación alogénica.

Una semana después del trasplante los fragmentos trasplantados en combinación alogénica presentaban, macroscópicamente, un aspecto abultado netamente mayor que lo observado en el caso de las ratas atímicas. Había numerosos linfocitos que infiltraban el tejido 1 semana después del trasplante (Fig. 220) y en muchas zonas era posible distinguir abundantes células necróticas (Fig. 221). Los linfocitos se situaban por todo el trasplante pero especialmente en las cercanías entre el injerto y el riñón presentando esta zona un aspecto totalmente similar al encontrado en los trasplantes que realizamos en la situación equivalente con fragmentos cultivados adheridos al soporte de cultivo. Esta situación se encontró, además, independientemente de si se trataba de fragmentos control (Fig. 222) o tratados con dGuo (Fig. 223) o CsA (Fig. 224). En la parte más externa había un tejido fibroso donde abundaban macrófagos y linfocitos con formación de grandes vasos sanguíneos (Fig. 225). Al contrario de los trasplantes en los animales atímicos y eutímicos en combinación singénica, el borde entre el tejido renal y el trasplante no era siempre claro y se observaban infiltrados linfoides entre los túbulos renales (Fig. 226). Si bien a nivel histológico no fue fácil la identificación de las bandas de células epiteliales descritas en el caso de los trasplantes en las ratas "nude" y en las eutímicas en combinación singénica, inmunohistoquímicamente se detectaron células positivas para citoqueratina (Figs. 227, 228, 229) y para moléculas del MHC de clase II del haplotipo donante (Figs. 230, 231) principalmente en la parte más externa del trasplante. No obstante, la tinción parecía profundamente alterada en comparación a lo observado con ratas atímicas o en las ratas eutímicas en combinación singénica. Más cerca del tejido renal había pequeños núcleos de células epiteliales que se teñían también con los anticuerpos OX-18, ER-13 y F17-23-2 pero nunca observamos una tinción positiva para estos anticuerpos monoclonales en el borde entre tejido renal y trasplante. En la proximidad de las células epiteliales también fue posible distinguir células picnóticas. La mayoría de los linfocitos que infiltraban el trasplante se tiñeron con alta intensidad con R73, OX-19, ER-2 y

OX-8 (Figs. 232, 233, 234, 235). Además en toda la superficie del trasplante fue posible distinguir numerosos granulocitos eosinófilos y macrófagos ED1 y ED2 positivos (Fig. 236).

Los trasplantes analizados a las 2 semanas mostraron todavía restos de los acúmulos de tejido próximos a los túbulos renales, una considerable infiltración linfoide y una mayor presencia de tejido conectivo con aumento considerable de las masas de colágeno (Figs. 237, 238, 239). Por el contrario, era muy difícil observar bandas de células epiteliales (Fig. 240).

También continuaban existiendo en el tejido conectivo numerosos eosinófilos y macrófagos (Fig. 241).

Después de 3 semanas la mayoría del tejido consistía exclusivamente de una matriz conectiva compuesta de células fibroblásticas y masas de colágeno (Figs. 242, 243) donde no se observaron células positivas para queratina o para el anticuerpo F17-23-2. El número de linfocitos se había reducido considerablemente concentrándose en los bordes entre el tejido renal y el fragmento trasplantado (Fig. 244). Como en anteriores ocasiones no encontramos grandes diferencias significativas en el comportamiento entre ratas trasplantadas con fragmentos cultivados en medio o tratados con dGuo o CsA.

## **DISCUSSION**

El primer objetivo de este trabajo fue desarrollar y caracterizar cultivos primarios de estroma tímico de rata, siguiendo la metodología descrita en ratón por PAPIERNIK y NABARRA (1981). El interés de este primer objetivo se basaba en las numerosas discrepancias existentes en la literatura acerca de los tipos celulares presentes en estos cultivos, su forma de evolución temporal, características fenotípicas y la posible relación que liga estas células entre sí en el cultivo y con los elementos estromáticos caracterizados in situ en el timo. En este sentido, los tipos celulares encontrados son, en nuestro caso, iguales a los descritos en ratón (PAPIERNIK y col., 1983) y muy recientemente en cultivos de estroma de rata (COLIC y col., 1991), esto es, fibroblastos, células epiteliales, macrófagos y una población heterogénea de células PTR (células fagocíticas del retículo tímico, denominadas así por PAPIERNIK y col., 1983). Nosotros, además, describimos la presencia de células dendríticas que, en el caso de los trabajos comentados en ratón, se consideraban equivalentes a las PTR.

Aunque cualitativamente los tipos celulares presentes en nuestros cultivos son básicamente los mismos que los descritos in situ en el timo de mamíferos (DULJVESTIJN y HOEFSEMIT, 1981; VAN EWIJK, 1984; NABARRA y ANDRIANARISON, 1987; COLIC y col., 1989a; COLIC y col., 1990; NABARRA y ANDRIANARISON, 1991) hay discrepancias, no obstante, entre los diferentes resultados respecto a qué tipo celular es predominante in vitro y si ese predominio está relacionado con la edad del cultivo. Así, en cultivos de estroma tímico de rata se ha descrito tanto un desarrollo casi exclusivo de células epiteliales (ITOH, 1979; MATSUDA y col., 1985) como un desarrollo preferente de macrófagos (COLIC y col., 1991). Asimismo, en el caso del ratón se ha descrito tanto una proliferación predominante de células epiteliales (LOOR, 1979; MIYAZAWA y col., 1980; NIEBURGS y col., 1985; SAVINO y col., 1986; NAQUET y col., 1989; ESEEL y col., 1990; SCHREIBER y col., 1991) como la presencia mayoritaria de macrófagos (PAPIERNIK y col., 1983). En el caso humano, por el contrario, todos los autores coinciden en señalar un crecimiento casi exclusivo de células epiteliales (COHEN y col., 1984; SUN y col., 1984; BARTHELEMY y col., 1986; SAVINO y col., 1986; BALERCIA y col., 1990b; SCHREIBER y col., 1991).

Por otra parte en nuestras condiciones de cultivo los timocitos están presentes en el medio generalmente sólo durante la primera semana tras la cual aparecen necróticos. No obstante, el hecho de que en algunos frascos de cultivo se puedan encontrar células linfoides viables después de más de 10 días de cultivo sin estimulación debida a factores añadidos de forma exógena, contrasta con los numerosos datos al respecto donde se describe la total desaparición de los linfocitos en la primera semana (HONG y col., 1979; JENKINSON y col., 1982; SCHUURMAN y col., 1982; PAPIERNIK y col., 1983; READY y col., 1984). En este sentido, COLIC y col. (1991) en

cultivos de estroma tímico de rata realizados con un protocolo semejante al nuestro encuentran de igual modo que, después de 7 días, entre un 50-60% de las células no adherentes de estos cultivos son linfocitos viables y después de 20 días el porcentaje se ha reducido (0,5-2%), pero no han desaparecido totalmente. Aunque estos autores no dan explicación alguna sobre este hecho, nosotros pensamos que algunas de las células del estroma presentes en el cultivo podrían producir factores de crecimiento que mantuviesen esa proliferación.

Sin embargo, no se había descrito anteriormente que se produjese, en condiciones similares a las que nosotros trabajamos e independientemente de la especie utilizada, un reinicio de la proliferación linfóide después de largos períodos de tiempo (después de 2 semanas) en los frascos de cultivo en los que los linfocitos habían desaparecido por completo. El hecho de que aparezcan en la proximidad de los fragmentos y a que, como se discutirá más adelante, en el interior de los fragmentos haya células con características de blastos, nos hace pensar que algunas de éstas podrían mantenerse en el microambiente del fragmento y proliferar fuera de él en días posteriores. En este sentido, se ha demostrado repetidamente que líneas celulares de estroma pueden mantener el crecimiento y maduración de timocitos in vitro gracias a factores solubles (PALACIOS y col., 1989; DALLOUL y col., 1991; WATANABE y col., 1991).

Las células epiteliales del timo in situ muestran una clara heterogeneidad tanto morfológica como determinada por anticuerpos monoclonales (NABARRA y ANDRIANARISON, 1987; KAMPINGA y col., 1989; COLIC y col., 1989a). Las diferencias morfológicas que nosotros hemos encontrado en los cultivos primarios de estroma de rata se centran en primer lugar en la diferente morfolología de estas células en las colonias, adherentes y poligonales frente a células semiadherentes redondeadas y en segundo lugar y, posiblemente como consecuencia de ello, la diferente expresión de moléculas del MHC de clase II en ambos tipos celulares (baja en las adherentes y alta en las semiadherentes). En este mismo sentido, COLIC y col. (1989b) demuestran, mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos que, la población epitelial mayoritaria que prolifera tiene un fenotipo medular, si bien no hacen referencia a la morfolología de dichas células en el cultivo. Más adelante, cuando discutamos sobre las características de las células epiteliales dentro del fragmento comentaremos las posibles implicaciones que puede tener el hecho de que existan uno o más tipos celulares en los cultivos.

Mientras que la expresión de moléculas del MHC de clase I es homogénea e independiente de la morfolología de las células epiteliales, la de moléculas del MHC de clase II está directamente relacionada con la morfolología: baja en las células adherentes y alta en las redondeadas



semiadherentes. Tanto in vivo (VAN EWIJK, 1984; DE MAAGD y col., 1985) como en líneas epiteliales de ratón (NAQUET y col., 1989) y en cultivos primarios de estroma tímico de ratón (JENKINSON y col., 1980; ESHEL y col., 1990) se ha observado una expresión alta de moléculas del MHC de clase II en las células epiteliales. La pérdida de expresión de moléculas del MHC de clase II observada no sólo por nosotros sino también por otros autores (SUN y col., 1984; PALACIOS y col., 1989) podría relacionarse con el proceso de adherencia, si bien en otros casos se ha encontrado un nivel similar de expresión en células adherentes y en células redondeadas no adherentes (LOOR, 1979).

Creemos que el proceso de adherencia podría justificar la ausencia de asociaciones entre células epiteliales y timocitos que observamos en nuestro sistema de cultivo. Aunque el sistema utilizado es diferente y llevado a cabo con líneas epiteliales, una prueba que apoyaría esta idea es que en experimentos en los que las líneas de células epiteliales se extraen del cultivo por tripsinización (lo que implica un cambio en su morfología de extendida a redondeada) sí son capaces de interactuar con timocitos (SINGER y col., 1986; MUÑOZ-BLAY y col., 1987). Por otro lado, también se ha descrito la diferenciación de timocitos en presencia de líneas epiteliales comprobándose que se producía contacto entre ambos tipos celulares (PALACIOS y col., 1989). En este caso, sin embargo, la morfología de las células epiteliales clonadas es totalmente diferente a la descrita por nosotros puesto que estas células se mantienen poco adherentes a la superficie del cultivo.

No obstante, también está descrita la asociación de linfocitos en cultivo con líneas de células epiteliales adherentes en el caso de la rata (LUPIN y col., 1989). Al igual que lo demostrado en nuestros resultados para las moléculas del MHC de clase II, la adherencia podría implicar la pérdida de otras moléculas en la superficie de las células epiteliales (por ejemplo las que estuviesen implicadas en la adherencia célula epitelial-timocito) por lo que los resultados encontrados por LUPIN y col. podrían justificarse si dichas moléculas se regulasen de forma distinta, pese al proceso de adherencia, en la línea epitelial que ellos utilizan.

La expresión de citoqueratina es, como en el caso de las moléculas del MHC de clase II, variable en las células epiteliales. A diferencia de las moléculas del MHC, la variabilidad en la expresión de citoqueratina es independiente de la morfología de la célula. Las queratinas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas y, al contrario que otros filamentos intermedios como vimentina, desmina o neurofilamentos, se componen de muchos polipéptidos diferentes con un peso molecular total que varía entre 40.000 y 68.000. Los polipéptidos se expresan en diferentes

tejidos en combinaciones diferentes de forma que un epitelio o célula epitelial determinada puede ser caracterizada por su patrón específico de expresión de citoqueratinas (MOLL y col., 1982).

Se han caracterizado diferentes patrones de expresión de polipéptidos de queratina en diferentes tipos de células epiteliales en cultivo. En algunas líneas celulares las queratinas sintetizadas son iguales a las encontradas en los tejidos a partir de los cuales se obtuvieron las células del cultivo mientras que en otros son diferentes, lo que implicaría una diferente modulación de la expresión en el tejido in vivo y en el cultivo in vitro (FRANKE y col., 1982). No obstante, también se ha descrito que, pese a que las queratinas sintetizadas por queratinocitos cultivados son iguales durante los primeros días de cultivo a las sintetizadas por las células epiteliales epidérmicas, pueden sufrir cambios durante la diferenciación terminal, con la aparición de nuevas queratinas a partir de diferentes mRNA de forma que, en cultivo, también existe una modulación en la expresión de las queratinas (FUCHS y GREEN, 1980).

Teniendo en cuenta que el anticuerpo que nosotros utilizamos es policlonal pero dirigido contra moléculas de 56 y 64 kD, la diferente intensidad de tinción que encontramos se podría deber, bien a que hay células que no expresan este tipo concreto de queratinas, bien a que lo expresan en baja cantidad. Hay que tener en cuenta, no obstante, que el anticuerpo policlonal que nosotros hemos utilizado está dirigido contra queratina humana. Esto podría inducir a pensar que el anticuerpo no reconoce las queratinas que se expresan en las células de rata negativas. No creemos, sin embargo que este hecho pueda ser suficiente para explicar la diferente tinción puesto que las queratinas es un grupo de proteínas extraordinariamente conservado en la evolución y, en cualquier caso, la tinción se realiza en una misma colonia con el mismo anticuerpo, obteniéndose diferentes grados de tinción.

Las PTR constituyen una población de células que muestran las mismas características morfológicas y esencialmente los mismos marcadores que los descritos previamente en PTR de ratón (PAPIERNIK y col., 1983 y 1986). Son células redondeadas, muy refringentes cuando se observan bajo microscopía de contraste de fases y que poseen un citoplasma ocupado por numerosas vesículas y fagosomas de desarrollo variable. Además, tienen una alta capacidad proliferativa y de fagocitosis formando en los primeros días de cultivo asociaciones con linfocitos. En cultivos de estroma de rata COLIC y col. (1991) describen la presencia, por un lado, de una población heterogénea de células que denominan como "células no adherentes" y sugieren que podrían ser equivalentes a las PTR descritas por PAPIERNIK y col. (1983) y, por otro, de "macrófagos adherentes". Las "células no adherentes" proliferan en los 3-4 primeros días de cultivo a partir

de los fragmentos, adhiriéndose al sustrato alrededor de los mismos, mientras que los "macrófagos adherentes" comienzan a proliferar después de 7 días, alcanzando su máxima proliferación después de 2 semanas. Después de esto se produce un crecimiento de fibroblastos tal que impide la proliferación de macrófagos y células epiteliales. En nuestro caso la proliferación de fibroblastos se produce ya desde el primer día de cultivo y la máxima proliferación de PTR se produce en la primera semana de cultivo, a la vez que las PTR se adhieren al sustrato originando los macrófagos de tipo 1 y 2. Aunque COLIC y col. (1991) no relacionan en ningún momento ambos tipos celulares, los resultados podrían considerarse semejantes a los nuestros si considerásemos las "células no adherentes" equivalentes a las PTR y los "macrófagos adherentes" a los macrófagos de tipo 1 y 2. En este caso, habría que matizar, no obstante, que probablemente la máxima proliferación de "macrófagos adherentes" que ellos describen a las 2 semanas de cultivo reflejase más bien la adherencia de las células no adherentes al sustrato, más que una proliferación propiamente dicha de los "macrófagos adherentes".

Durante la primera semana de cultivo entre un 30% y un 50% de las PTR expresan moléculas del MHC de clase II y este porcentaje disminuyó hasta menos de un 10% después de dos semanas. Esta disminución en el porcentaje de células que expresan moléculas del MHC de clase II, se había descrito también en PTR de ratón. En este caso, PAPIERNIK y col. (1986) demuestran, en cultivos primarios de estroma de ratón similares a los presentados en este trabajo, que la presencia en el medio de cultivo de IFN-gamma producido por los linfocitos controla el porcentaje de PTR que expresan moléculas del MHC de clase II, de forma que a medida que los timocitos desaparecen del cultivo el porcentaje de PTR que expresan moléculas del MHC de clase II disminuye.

COLIC y col. (1991) en cultivos de estroma de rata encuentran, entre las "células no adherentes" (previamente comentadas), que casi la totalidad expresan moléculas del MHC de clase II independientemente del tiempo de cultivo. En nuestro caso, al igual que los descrito por PAPIERNIK y col. (1986) en PTR de ratón, entre un 50% y un 70% de las PTR expresan moléculas del MHC de clase II en la primera semana, porcentaje que se pierde después de más de 7 días. Los diferentes resultados podrían deberse a la presencia de numerosos linfocitos vivos en el cultivo en el caso de los cultivos descritos por COLIC y col. (1991): entre un 50-60% de las "células no adherentes" a los 7 días son linfocitos viables y entre un 5-10% después de 12 días.

En nuestro caso, además, es importante resaltar que las moléculas del MHC de clase II aparecen no sólo en la superficie de las PTR sino también en la membrana de vesículas

intracitoplásmicas, lo cual podría reflejar un rápido recambio de membrana como ya se ha descrito para macrófagos en cultivo (COHN y STEINMAN, 1982).

Entre un 50% y un 70% de las PTR se tiñen con el anticuerpo monoclonal OX-42. Mac-1 es una molécula de adhesión de la familia de las integrinas. Esta molécula es un heterodímero formado por una cadena  $\beta$  de 95kD (CD18) igual a la de LFA-1 y p150,90 y una cadena  $\alpha$  diferente de 165 kD (CD11b) que actúa como receptor de, al menos, dos ligandos: ICAM-1 y del factor del complemento de tipo 3 (HEMLER, 1988; BELLER y col., 1982). En el caso de la rata, OX-42 es un anticuerpo que reconoce CD11b y CD11c (cadena  $\alpha$  de p150,90) y, por tanto, la reactividad no es exactamente equivalente a Mac-1 (ROBINSON y col., 1986).

EL ROUBY y col. (1985) demostraron que las rosetas PTR-timocitos en el caso del ratón, estaban mediadas por la molécula Mac-1 expresada en las PTR y que los linfocitos que interaccionaban con las PTR presentaban un fenotipo inmaduro ( $CD4^+CD8^+$ ). Además, cuando éstos eran inyectados intravenosamente en ratones congénicos irradiados eran capaces de repoblar el timo. Además, la molécula era básica en la proliferación inducida por las PTR a los timocitos (PAPIERNIK y col., 1987). Por tanto, el hecho de que esta molécula esté implicada en procesos de adhesión celular y que se exprese en células del estroma tímico de rata podría tener importancia en los procesos de diferenciación intratímicos como sugirieron EL ROUBY y col. (1985).

A medida que las PTR se hacían adherentes y presumiblemente se convertían, como veremos más adelante, en macrófagos de tipo 1 y 2, perdían la expresión de OX-42 quizás de modo similar a lo descrito para las moléculas del MHC de clase II, pero en clara contraposición a lo observado en cultivos similares de rata por COLIC y col. (1991). En este caso los autores describen que los porcentajes de macrófagos adherentes positivos para OX-42 (más del 95%) son similares a los de los no adherentes y, por tanto, no observan influencia de la adherencia al sustrato en la expresión de estas moléculas.

Entre un 30% y un 50% de las PTR expresan IL-2Ra detectado por el anticuerpo monoclonal OX-39. Aunque no está claro cuál es el significado biológico de la expresión de receptores de IL-2 en células no linfoides (HERRMAN y col., 1985; HANCOCK y col., 1987a; HANCOCK y col., 1987b; ROCHA y col., 1988; MACPHERSON y col., 1989) se ha especulado que la IL-2 no es únicamente una hormona linfotrópica sino que podría influir en el desarrollo de otros tipos celulares. No obstante, otros autores han observado que los monocitos y líneas celulares leucémicas sólo

expresan IL-2R en presencia de IFN-gamma (HERRMAN y col., 1985). Mientras que en el caso de las PTR de ratón ROCHA y col. (1988) han demostrado que pueden proliferar en presencia de rIL-2, otros autores encuentran que la interacción IL-2/IL-2R en células no linfoides no induce proliferación celular (HERRMAN y col., 1985; KOYASU y col., 1986; PALACIOS y VON BOEHMER, 1986; STEINER y col., 1986; BANDEIRA y col., 1987). Además, otros datos señalan que la proliferación se produce sólo en precursores de macrófagos cuando son estimulados largos períodos de tiempo con rIL-2 pero no en macrófagos maduros (BACCARINI y col., 1989). En este sentido cabe señalar que las PTR son una población heterogénea de células que probablemente incluye tanto precursores como macrófagos maduros. En el caso del ratón se ha demostrado que los timocitos inmaduros son los que expresan IL-2R durante el proceso de maduración intratímica y que posteriormente pierden este marcador (CEREDIG y col., 1985; LESLEY y col., 1988). Asimismo BENVENISTE y MERRILL (1986) y MALKOVSKY y col., (1987) han sugerido que la expresión de IL-2R podría ser también un paso intermedio en el proceso de diferenciación mieloide.

La heterogeneidad de las PTR queda también reflejada en la expresión de los anticuerpos ED1 y ED2: aproximadamente la mitad de las PTR en los cultivos primarios son positivas para ED1 y también el 50% lo son para ED2. Por otro lado, nosotros observamos que la mayoría de las PTR fagocitan partículas de carbón y levaduras inactivadas y que dicha fagocitosis disminuye cuando las PTR se van adhiriendo al soporte de cultivo. Se ha descrito que la fagocitosis podría ser asociada con el fenotipo de los macrófagos puesto que los macrófagos ED1<sup>+</sup> de pulpa roja son fagocíticos, aunque anticuerpos anti-ED1 no inhiben la fagocitosis, mientras que los ED2<sup>+</sup> no lo son, si bien estos resultados están obtenidos con macrófagos de bazo (KAMPINGA y ASPINALL, 1990).

Teniendo en cuenta que, en timo, ED1 tiñe macrófagos en la corteza y la médula mientras que ED2 tiñe sólo macrófagos corticales y del borde córtico-medular (DIJKSTRA y col., 1985) el patrón de tinción que nosotros encontramos en las PTR en cultivo podría reflejar la diferente procedencia de los mismos. No obstante también se ha descrito que ED2, al contrario que ED1, es un marcador de maduración puesto que en cultivos de médula ósea los monocitos no adherentes no lo expresan mientras que los macrófagos maduros adherentes sí (DAMOISEAUX, 1991). Este autor también demuestra que la expresión de ED2 es inducible cuando los precursores no adherentes se fijan a superficies plásticas. Estos resultados contrastarían con el hecho de que la mitad aproximadamente de las PTR, células no adherentes y precursores, en nuestra opinión, de los macrófagos adherentes del cultivo, expresasen ED2. Probablemente la situación no es estrictamente equivalente y quizás parte de las PTR (las ED2<sup>+</sup>) sean más maduras que los precursores comentados

en los cultivos de médula ósea. También en este sentido COLIC y col. (1991) encuentran que, aunque la expresión de ED2 aumenta en los macrófagos adherentes respecto a los no adherentes, éstos presentan un porcentaje (45-75%) que no difiere mucho del que nosotros encontramos. Sin embargo, también se ha observado expresión de ED2 en células no adherentes tras entrar en contacto con células fibroblásticas de la médula ósea (BARBE y col., 1990) e in vivo, el 50% de los macrófagos peritoneales libres expresan ED2 (HUME y col., 1983, DAMOISEAUX y col., 1989). Estos autores han concluido consiguientemente que la interacción de los macrófagos con los elementos adherentes es necesaria para inducir la expresión de ED2, pero no para su mantenimiento (BARBE y col., 1990).

Los macrófagos adherentes, células de forma irregular y citoplasma extendido que se podían observar tanto en áreas libres de fibroblastos (macrófagos de tipo 1) como en zonas de fibroblastos (macrófagos de tipo 2), no expresaron moléculas del MHC de clase II teniendo una baja capacidad proliferativa y de fagocitosis.

Los macrófagos de tipo 1 y 2 se tiñeron en un 50% para los anticuerpos ED1 y ED2 y por tanto no observamos que se produjese un aumento en la expresión de ED2 como se ha descrito en los cultivos de médula ósea comentados anteriormente (ARREMA, 1992).

Respecto a las moléculas del MHC de clase II los macrófagos obtenidos de diferentes órganos varían en su expresión basal de moléculas del MHC de clase II (COWING y col., 1979) lo que puede reflejar por un lado la existencia de subpoblaciones y por otro la posible variación debida a estímulos (FALK y col., 1988). Algunos autores han sugerido que la biosíntesis y expresión de antígenos del MHC de clase II es más un fenómeno transitorio en todos los macrófagos murinos que el resultado de la existencia de diferentes subpoblaciones (BELLER y HO, 1982). En este sentido, se ha demostrado repetidamente que los macrófagos peritoneales (BELLER y UNANUS, 1981), tímicos (BELLER y col., 1980) y de bazo (COWING y col., 1979) sufren la pérdida de expresión de moléculas del MHC de clase II cuando son puestos en cultivo lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados y los encontrados por COLIC y col. (1991) entre la población que denominan "macrófagos adherentes" en cultivos de estroma de rata.

En los cultivos de estroma tímico de rata las células dendríticas se caracterizaron por su alta expresión de moléculas del MHC de clase II, su baja capacidad proliferativa y por la ausencia de marcadores como OX-42, IL-2R, ED1 y ED2 y las actividades enzimáticas NSE y APH, lo que está de acuerdo con lo que ya se conocía en humano (PELLETIER y col., 1986; KNIGHT y col.,

1987; LANDRY y col., 1988) y cobaya (AIDA y col., 1988). En cultivo forman asociaciones con timocitos similares a las descritas previamente en aislamientos de complejos tímicos (KYEWSKI, 1987; SHORTMAN y col., 1989; PRICKET y HART, 1990) e in vitro (LANDRY y col., 1989; LANDRY y col., 1990).

No se observaron figuras mitóticas de células dendríticas ni captaron BrdU en la prueba de proliferación mediante anticuerpos anti-BrdU lo que indicaría que esta población celular no prolifera. Sin embargo, el hecho de que se puedan observar células pequeñas redondeadas BrdU<sup>+</sup> similares a monocitos con alta expresión de MHC clase II y de figuras intermedias entre éstas y las descritas como típicamente dendríticas (Fig. 17) podría sugerir que estas células representan precursores de células dendríticas tímicas. Algunos resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio tras el análisis del ciclo celular de poblaciones purificadas de células dendríticas obtenidas con protocolos similares a los aquí descritos, demuestran que, en efecto, entre un 2% y un 4% de las células dendríticas proliferan en cultivo.

COLIC y col. (1991) observan, entre la población de macrófagos adherentes, células de morfología irregular o fusiforme con prolongaciones citoplásmicas dendríticas que las asemejarían, en su opinión, a las IDC tímicas. En nuestro caso es evidente que tanto entre los macrófagos de tipo 1 como de tipo 2 hay células con la misma morfología "dendrítica" descrita por COLIC y col. (1991) pero que, sin embargo, mantienen características propias de macrófagos: positivos para las actividades enzimáticas NSE y APH, numerosos gránulos y vesículas citoplásmicas y expresión de marcadores típicos de macrófagos como ED1 y ED2. Por tanto, las características morfológicas descritas por estos autores nos inducen a pensar que realmente se trata de macrófagos que puedan tener prolongaciones citoplásmicas, más aún si se tiene en cuenta que no existen apenas "células adherentes" que expresen moléculas del MHC de clase II en los cultivos descritos por COLIC y col. (1991) (inesperado si dichas células "dendríticas" fuesen realmente equivalentes a las IDC tímicas).

La expresión de Mac-1 en células dendríticas había sido descrita tanto en el caso de monocitos humanos circulantes (FREUDHENTAL y STEINMAN, 1990) y en bazo y pulmón de ratón (GIROLOMONI y col., 1990; POLLARD y LIPSCOMB, 1990). Asimismo se ha encontrado en DC de ratón aisladas y cultivadas con un protocolo igual al utilizado por nosotros (ARDAVIN y SHORTMAN, 1992) y en DC aisladas y cultivadas en el caso humano (LANDRY y col., 1988).

En este sentido, la ausencia de este marcador en las DC en los cultivos primarios de rata contrastan con los resultados obtenidos por LANDRY y col. (1990) en el caso de DC humanas aisladas y cultivadas y con los de KAMPINGA y ASPINALL (1990) que encuentran, in situ, células dendríticas positivas para OX-42 en la médula tímica de rata. En este mismo sentido también hay discrepancias en lo referente a la expresión del receptor de IL-2 en DC: mientras que en estudios in situ, KAMPINGA y ASPINALL (1990) y PATERSON y WILLIAMS (1987) encuentran células interdigitantes positivas para OX-39 en la médula tímica, nosotros no encontramos este marcador ni en las células dendríticas en cultivo ni, como veremos más adelante, en las DC aisladas de timo y cultivadas. Tanto en el caso de OX-42 como en el de OX-39 es posible que se produzca una modulación en la expresión de estos marcadores de forma que, después de 6 ó 7 días en que nosotros encontramos células dendríticas en el cultivo primario, no detectemos estos marcadores. Igualmente también sería posible que sí expresen estos marcadores los precursores de las DC y que los perdiesen cuando maduran y se adhieren al sustrato.

A tenor tanto de las características morfológicas como de la capacidad proliferativa y de fagocitosis, así como de la expresión de los diferentes marcadores analizados pensamos que los macrófagos observados en los cultivos primarios de estroma tímico de rata se originarían a partir de las que hemos denominado como PTR. Así, la presencia de formas intermedias entre PTR y macrófagos de tipo 1 y 2 nos sugiere que éstos se originarían a partir de aquéllas simplemente por un proceso de adherencia. En el caso en que las PTR se adhiriesen directamente al soporte de cultivo originarían los macrófagos de tipo 1 (esta secuencia sugerida se observa en la Fig. 31 con flechas en blanco) mientras que en el caso de adherirse en zonas donde previamente existía una monocapa de fibroblastos, originarían los macrófagos de tipo 2 (secuencia sugerida en Fig 32 con flechas en blanco). Este proceso implicaría el aumento de la adherencia al sustrato, la disminución de la capacidad proliferativa y de fagocitosis y la pérdida de expresión de moléculas del MHC de clase II y del IL-2R junto con la ausencia de tinción con el anticuerpo OX-42 (FIGURA V).

Por otro lado, la presencia de células de aspecto monocítico que expresan fuertemente moléculas del MHC de clase II y de formas intermedias entre éstas y las células dendríticas nos hace pensar que éstas podrían originarse a partir de las primeras (esta secuencia sugerida se observa en la Fig. 17 con flechas en blanco).

No podemos asegurar, sin embargo, que los precursores de PTR, y por tanto de los macrófagos, y los precursores de las DC sean el mismo o diferentes y que estos precursores tengan



capacidad ilimitada de proliferación. Tampoco podemos excluir que en realidad lo que hemos denominado como PTR en los cultivos de rata sea realmente una población heterogénea de células que pudiese contener no sólo un componente mayoritario de células macrofágicas (que originarían los macrófagos de tipo 1 y 2) sino también precursores de DC.

En este sentido, la pertenencia de las células de Langerhans (LC) de la piel, células "veiled" (VC) de la linfa, células dendríticas del bazo y células interdigitantes (IDC) de la médula tímica al sistema mononuclear fagocítico es una cuestión por resolver puesto que no está claro cuál es el verdadero origen de estos tipos celulares. Por un lado podrían constituir una línea hematopoiética diferente a la de los fagocitos mononucleares puesto que, a diferencia de ellos, no tienen en general capacidad fagocítica, no proliferan in vitro, expresan constitutivamente moléculas del MHC de clase II y su única especialización funcional es la de ser potentes estimuladores de las respuestas linfoides primarias (AUSTYN, 1987). Además, las DC no se ven afectadas por factores que sí afectan a los macrófagos como M-CSF y G-CSF (STEINMAN, 1991).

Otros resultados, por el contrario, parecen situar en la misma línea de diferenciación los tipos celulares mencionados dentro de la línea mononuclear fagocítica. Así, las DC fagocitan en ciertas circunstancias (FOSSUM y col., 1984; HSIAO y col., 1991) y las células monocíticas de sangre se transforman en células con características de células dendríticas in vitro (PETERS y col., 1987; KABEL y col., 1989). Además, las LC de piel y las IDC de la médula tímica en ratón, pese a tener una morfología típicamente dendrítica, no contiene gránulos de Birbeck (STEINMAN, 1991), al contrario que las IDC tímicas en rata (DUSSIANT-DEMYLLE y col., 1991). Por otro lado, las LC humanas expresan receptores para el complemento, inducibles con IL-4 e IFN-gamma, que no están presentes en las DC (BIRBER y col., 1989).

Por último hay que destacar que la asignación de un tipo celular a una línea u otra se hace, a veces, dependiendo de la expresión de determinados marcadores lo que hace aún más difícil el problema puesto que algunos de los mismos cambian en determinadas circunstancias. Así, las LC de ratón pierden, en cultivo, los gránulos de Birbeck, las actividades NSE y APH, el marcador F4/80 (positivo in situ), los receptores FcR, ultraestructuralmente son semejantes a las DC linfoides (SCHULER y STEINMAN, 1985) y aumenta la expresión de moléculas del MHC (ROMANI y col., 1989). Por otro lado, aunque la distribución citoplásmica de las enzimas APH y NSE es diferente entre DC (débil y perinuclear) y macrófagos (más intensa y en todo el citoplasma), hay formas intermedias (DUIJVESTIJN y col., 1983).

En especial y en referencia a lo que sucede en el timo quizás habría que matizar, si no modificar, el término mononuclear-fagocítico. En concreto las células DN pueden ser separadas en subpoblaciones  $CD4^{low} CD8^{-}$ ,  $CD4^{-} CD8^{-} IL-2R^{-}$ ,  $CD4^{-} CD8^{-} IL-2R^{+}$ , poblaciones que podrían dar lugar a linfocitos pero que, con los estímulos adecuados, también podrían originar macrófagos o IDC. En este sentido, PAPIERNIK y NABARRA (comunicación personal) demostraron que el tratamiento con IL-2 y GM-CSF de la población  $CD4^{-} CD8^{-} Mac-1^{-} Ia^{-}$  la inducía a proliferar a la vez que se formaban, determinado a microscopía electrónica, tanto macrófagos como IDC, además de linfocitos. Por el contrario, si el tratamiento era con IL-1 e IL-2 sólo aparecían IDC.

En la segunda parte de este trabajo hemos realizado una caracterización morfo-fenotípica de poblaciones enriquecidas de macrófagos y células dendríticas aislados de timo para contrastar sus características en esta situación con las de las posibles células equivalentes presentes en los cultivos primarios. Además, se han estudiado los cambios fenotípicos que estas células sufren durante el período de cultivo y los que se producen por acción de algunas citocinas que podrían ser importantes in vivo en los procesos de maduración y diferenciación intratímicos.

El protocolo de aislamiento y cultivo de estas poblaciones está basado en primer lugar en la baja densidad de los monocitos y las células dendríticas en comparación con la alta densidad de los linfocitos (KNIGHT y col., 1982 y 1986), por lo que ambas fracciones son fácilmente distinguibles cuando la suspensión celular es centrifugada en gradientes de densidad. En segundo lugar se ha llevado a cabo una adherencia diferencial a una superficie de plástico (YOUNG y STEINMAN, 1988): mientras que las células dendríticas permanecen adherentes sólo por un período de 12-16 horas, los macrófagos permanecen adherentes durante varios días comenzando a proliferar después de la primera semana de cultivo.

Mediante este protocolo hemos obtenido un enriquecimiento superior al 95% tanto en el caso de los macrófagos como en el de las células dendríticas.

Nuestros resultados demuestran que los macrófagos aislados de timo de ratas Wistar y cultivados 1 día muestran la misma morfología que la descrita para las que denominamos PTR en los cultivos primarios y esta morfología se mantiene en los macrófagos que se cultivaron y proliferaron activamente después de una semana de cultivo. Este hecho apoya de nuevo nuestra idea de que la PTR de los cultivos primarios son el tipo celular equivalente de los macrófagos tímicos observados in situ. Al igual que lo comentado en el caso de los cultivos primarios, los

macrófagos que se van adhiriendo a la superficie del cultivo en estos aislamientos, adquieren las características de los macrófagos de tipo 1 descritas en los cultivos primarios.

En los macrófagos cultivados se produce una reducción con el tiempo en el porcentaje de células que expresan moléculas del MHC de clase II: de un 50-60% en macrófagos de día 1 a un 10-20% en macrófagos de día 30. Esta disminución en el porcentaje coincide aproximadamente con la descrita para las PTR en los cultivos primarios. Además, la expresión de estas moléculas puede ser inducida de nuevo si los macrófagos cultivados de día 30 se tratan con rIL-2 o con Con A-SCM.

Al contrario que nosotros, BECKER y DANIEL (1990) encuentran, en monocitos circulantes aislados, que la rIL-2 no induce la expresión de moléculas del MHC de clase II. No podemos concluir que la inducción que nosotros encontramos se produzca por un efecto directo o mediado por otros factores; por ejemplo, concentraciones altas de IL-2 incrementan la producción de TNF- $\alpha$  por macrófagos (MALKOVSKY y col. 1987; STRIETER y col., 1989) y el TNF- $\alpha$ , así como GM-CSF, pueden aumentar la expresión de moléculas del MHC de clase II (WATANABE y JACOB, 1991; BENOIST y MATHIS, 1990). La mediación también podría ser debida a IFN-gamma que es uno de los principales inductores de la expresión de moléculas del MHC de clase II (VIRELIZIER y col., 1984). Por tanto la inducción de moléculas del MHC de clase II podría ser controlada por una estimulación autocrina a través de la producción de IFN-gamma, TNF- $\alpha$  y/o GM-CSF por macrófagos en el cultivo. Por otro lado, tanto la presencia de IL-2 como de IFN-gamma en el medio Con A-SCM, podría explicar la inducción de moléculas del MHC de clase II.

El porcentaje de macrófagos cultivados que se teñían con el anticuerpo OX-42 era de un 60-70% a día 1 y de un 100% después de 30 días. Este aumento durante el período de cultivo también había sido descrito anteriormente en macrófagos de rata (WACKER y col., 1985) y en macrófagos no adherentes de estroma tímico de rata (COLIC y col., 1991). Debido a que la totalidad de los macrófagos se teñieron con OX-42 después de 30 días no estudiamos su posible inducción con rIL-2 o Con A-SCM. Sin embargo, algunos datos demuestran que en monocitos circulantes (BECKER y DANIEL, 1990) la rIL-2 no induce expresión de Mac-1 y en fagocitos mononucleares humanos (JAYARAM y col., 1989) no se encuentran efectos del IFN-gamma sobre Mac-1 ni sobre otros receptores de complemento como C1R y p150,95.

Por otro lado, el aumento en el porcentaje de macrófagos aislados y cultivados que se teñen con OX-42 contrasta con la completa eliminación de la expresión de este marcador cuando, en los cultivos primarios, las PTR se adhieren al sustrato del cultivo convirtiéndose en macrófagos

de tipo 1 ó 2. En el caso de los macrófagos cultivados éstos se mantienen no adherentes cuando son extraídos de la placa de cultivo. Por tanto, pensamos que las moléculas detectadas con OX-42 aumentarían su expresión durante el período de cultivo siempre que la célula no se adhiriese al soporte de cultivo. En este sentido, WACKER y col. (1985) demuestran que Mac-1 es un marcador que se expresa con la maduración de los macrófagos. Al igual que lo comentado para las PTR, esta molécula podría estar implicada en procesos de adhesión celular como EL ROUBY y col. (1985) demostraron entre timocitos y PTR en el caso del ratón.

La expresión de Thy-1, que nosotros hemos encontrado en macrófagos cultivados, ha sido previamente descrita en células no linfoides, tanto en células epiteliales de ratón (TUCEK y BOYD, 1990) como en células dendríticas aisladas de conducto torácico de rata (MACPHERSON, 1989) y células dendríticas de bazo (SETUM y col., 1991). No obstante, para el caso de las células epiteliales también se ha descrito la ausencia de este marcador (HE y col., 1991). Durante el período de cultivo de los macrófagos se produce la disminución de la expresión de Thy-1, que puede ser de nuevo inducida con Con A-SCM, lo que podría deberse a IL-3, presente en este medio, como se ha demostrado en células de médula ósea (SCHRADER, 1986).

Aunque no se conoce cuál es el papel exacto de esta molécula en células no linfoides podría estar implicada en la interacción con linfocitos y la activación de los mismos. En este sentido, HE y col. (1991) han demostrado que Thy-1 media la adhesión entre células epiteliales y linfocitos. Además, anticuerpos monoclonales anti-Thy-1 inhiben la interacción vía LFA-1 linfocito-célula epitelial (NISHIMURA y col., 1991).

Los macrófagos aislados de día 1 no expresan la molécula detectada por el anticuerpo OX-48, pero este marcador sufre una rápida inducción, y al cabo de 6 días de cultivo el 100% de los macrófagos la expresan. Aunque no ha sido descrito en macrófagos, sí se ha observado esta rápida inducción, como se comentará más adelante, en células dendríticas aisladas del conducto torácico de rata. En este sentido, OX-48 reconoce una molécula de función desconocida de peso molecular 70.kD asociada a la presencia del receptor de alta afinidad de IL-2, presente en linfocitos de rata activados con Con-A (SOMOZA y col., 1990). Parece por tanto que esta molécula podría expresarse cuando las células proliferan activamente.

A diferencia de las PTR en los cultivos primarios, los macrófagos aislados y cultivados no expresan IL-2R en ninguno de los períodos estudiados. Sin embargo, sí se consiguió la inducción de IL-2R por rIL-2 en macrófagos cultivados de día 30.

Se ha demostrado que los macrófagos alveolares humanos, monocitos y líneas celulares monocíticas expresan IL-2R después del tratamiento con rIFN-gamma humano (HANCOCK y col., 1987b) aunque en otros casos se ha demostrado que la rIL-2 sola no es capaz de activar macrófagos necesitándose para ello la cooperación con IFN-gamma o incluso con una tercera citocina (TNF- $\alpha$ ) (BELOSEVIC y col., 1990). En este sentido la inducción del IL-2R, tras incubación con Con A-SCM es probablemente debida a IL-2 y/o interferon-gamma.

Encontramos una diferencia en el porcentaje de macrófagos cultivados 30 días positivos para OX-39, dependiendo de si eran tratados con 50U/ml de rIL-2 o con Con A-SCM que contenía entre 30-35U/ml de IL-2: 80-100% en el primer caso y 30-50% en el segundo. Esta diferencia podría ser simplemente debida a la diferente procedencia de las IL-2: en el caso de la IL-2 humana se trata de un producto recombinante mientras que en el caso de la IL-2 de rata el ensayo biológico se realiza sobre una línea de ratón, por lo que las unidades exactas suministradas en ambos casos podrían no ser estrictamente equivalentes.

La diferente expresión de esta molécula en las PTR de los cultivos primarios y los macrófagos aislados y cultivados podría ser debida a factores, tales como IL-1 e IL-2, que estuviesen presentes en los cultivos primarios pero ausentes en los cultivos de células aisladas.

Por último comentaremos los resultados referidos al antígeno detectado por el anticuerpo OX-44. Dicho antígeno había sido descrito inicialmente en células linfoides por PATERSON y WILLIAMS (1987), estando presente en un estadio intermedio de diferenciación de los linfocitos T. Nosotros encontramos que este antígeno se expresa en macrófagos de día 1 en un 70-80% de las células y este porcentaje aumenta hasta un 100% a los 30 días. Se desconoce la función de esta molécula en las células no linfoides pero podría estar implicada en la maduración de las células T puesto que se ha demostrado que esta molécula media la transmisión de señales de diferenciación y regulación de la proliferación celular (BELLACOSA y col., 1991).

Los resultados que nosotros hemos encontrado respecto a los macrófagos, tales como la expresión de marcadores como OX-42, Thy-1, moléculas del MHC de clase I y II, inducción de algunos de estos marcadores con citocinas que podrían jugar un papel en la diferenciación T, así como los conocidos sobre la expresión *in situ* de moléculas del MHC de clase II y Mac-1 (BELLER y UNANUE, 1980; NABARRA Y PAPIERNIK, 1988), expresión de marcadores como ED1 y ED2 (DIJKSTRA y col., 1985) producción de IL-1 (HOWE y col., 1986) e interacción con timocitos (KYEWSKI, 1987) apoyan la idea de que los macrófagos tímicos no tendrían únicamente una mera función fagocítica

sino que podrían jugar un papel importante en la diferenciación de las células T, como ya había sido sugerido (BELLER y UNANUE, 1978; MILICEVIC y col., 1983). Otros datos también apoyan esta idea: en experimentos con ratones irradiados subletalmente los primeros linfocitos que entran al timo forman asociaciones con macrófagos dos o tres días antes de que lo hagan con células epiteliales (KYEWSKI, 1987). Además, durante la ontogenia (KYEWSKI y col., 1986) los primeros complejos timocito-macrófagos se pueden aislar desde el día 14-16 fetal mientras que los primeros complejos timocito-célula epitelial no se detectan antes del día 17. Asimismo existen pruebas indirectas que podrían apoyar este papel de los macrófagos: después del tratamiento con drogas antimitóticas en animales irradiados los primeros timocitos que entran en división se encuentran en el borde córtico-medular, donde hay numerosos macrófagos, y posteriormente se observan en la región subcapsular (PENIT y VASSEUR, 1988).

En las condiciones que hemos trabajado todas las células dendríticas aisladas de día 1 expresan moléculas del MHC de clase I y II, la molécula detectada por el anticuerpo OX-48 y Thy-1, aproximadamente la mitad se tiñe con OX-42 y entre un 70% y un 100% expresa la molécula detectada por el anticuerpo OX-44.

Por el contrario, no expresan CD4, IL-2R ni los marcadores de macrófagos ED1 y ED2 y la actividad de las enzimas NSE y APH es muy débil comparada con la de los macrófagos mostrando siempre una localización perinuclear.

A diferencia de las DC de los cultivos primarios, aproximadamente la mitad de las DC aisladas y cultivadas 1 día se tiñen con el anticuerpo OX-42, y, al igual que lo comentado para el caso de la asociación entre timocitos y PTR en ratón (EL ROUBY y col., 1985) podría mediar la interacción entre timocitos y células del estroma. La regulación en la expresión de este marcador no se estudió puesto que, como ya se comentó anteriormente, las células dendríticas mueren en cultivo después de una semana. No obstante, sí se ha descrito un aumento en el porcentaje de células positivas para OX-42 en DC de conducto torácico de rata. Así, mientras que el 40% de las células recién aisladas expresan esta molécula, el porcentaje disminuye a un 5%-10% después de 20-48 horas de cultivo (MACPHERSON, 1989). Este porcentaje a 20-48 horas (5%-10%) difiere considerablemente con el que nosotros obtenemos en las DC de día 1 que han sido cultivadas durante 12-16 horas (40%-50%). Esta diferente modulación podría ser debida bien a la diferente procedencia de las DC bien al momento en el que se realiza el estudio: 12-16 horas en nuestro caso y 20-48 horas en el de las DC de conducto torácico. Además, se ha descrito que la expresión

de este marcador no se da en la totalidad de la población, ni en el caso de la rata (MACPHERSON y col., 1989), ni en el del ratón (SCHULER y STEINMAN, 1985), lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados: sólo el 40-50% de las DC de día 1 se tiñen con este anticuerpo.

En contraste, el porcentaje que nosotros encontramos, analizado sobre citocentrifugaciones, es inferior al que se da en DC de rata aisladas y cultivadas con protocolos idénticos analizadas por citometría de flujo, donde la práctica totalidad de DC expresan este marcador (BAÑULS y col., remitido para publicación).

Al contrario que los macrófagos, la totalidad de las DC aisladas de día 1 expresaron Thy-1. En células dendríticas del conducto torácico de rata recién aisladas (MACPHERSON, 1989) se ha encontrado un porcentaje de células positivas para Thy-1 del 50% y este porcentaje se incrementa hasta el 95% después de 16-18 horas de cultivo. Este último porcentaje es similar al que nosotros encontramos si tenemos en cuenta que las células dendríticas que nosotros denominamos aisladas de día 1 permanecen realmente antes 12 horas en incubación.

Aunque clásicamente se había descrito como un marcador de células T, esta molécula también se ha encontrado, como ya se comentó anteriormente, en células epiteliales cultivadas de ratón (TUCEK y BOYD, 1990) y en DC de bazo (SETUM y col., 1991) lo que podría tener importancia, como ya se ha comentado anteriormente, en la interacción entre células del estroma y timocitos. Por el contrario, no se había encontrado este marcador en células dendríticas tímicas, ni en el caso humano (LANDRY y col., 1990) ni en el del ratón (ARDAVIN y SHORTMAN, 1992).

La diferencia de expresión para este marcador podría estar relacionada en el caso de las células dendríticas con la especie utilizada: positiva en rata y negativa en ratón. No obstante hay que resaltar que Thy-1 es una molécula altamente inducible y por tanto los diferentes resultados podrían deberse únicamente a diferentes condiciones de cultivo.

Como se comentó para los macrófagos, el anticuerpo OK-48 detecta una molécula en linfocitos de rata activados y, en nuestro caso, tiñe el 100% de las DC aisladas de día 1. En el caso de células dendríticas de conducto torácico la molécula detectada por OK-48 pasa de estar expresada en un 5-10% de las células recién aisladas a un 95% cuando las DC se cultivan durante una 18-20 horas (MACPHERSON, 1989). Estos resultados coinciden tanto con la rápida expresión del antígeno ya comentada para los macrófagos cultivados como con el porcentaje de DC positivas que nosotros encontramos después de 12-16 horas de cultivo.

En el caso del IL-2R, mientras que nosotros no observamos tinción con el anticuerpo OX-39 en las DC aisladas y cultivadas de día 1, las DC de conducto torácico (MACPHERSON y col., 1989) muestran un aumento del porcentaje de células que expresan esta molécula, de un 0-5% recién aisladas a un 100% tras 24 horas de cultivo y CROWLEY y col. (1989) demuestran este aumento tras inducción con GM-CSF. Además se ha observado una proliferación dosis dependiente con IL-2 (MACPHERSON y col., 1989). Al igual que lo discutido para OX-42, los diferentes resultados podrían deberse al origen de las DC o a las condiciones del experimento.

Resultados previos realizados en nuestro laboratorio con DC aisladas y cultivadas con protocolos similares y analizadas por citometría de flujo muestran una expresión diferente respecto al IL-2R. Estas son positivas para OX-39, con una baja intensidad, en un 50% de la población. En este sentido, las DC tímicas de ratón aisladas con un protocolo similar al nuestro sí expresan OX-39 (ARDAVIN y SHORTMAN, 1992) mientras que las DC de bazo de ratón son negativas (CROWLEY y col., 1989).

Al contrario que en el caso de los macrófagos cultivados el porcentaje de DC que expresaron el antígeno detectado por el anticuerpo OX-44 fué muy variable entre un 70% y un 100%. Al igual que lo comentado para ese caso, aunque se desconoce la función de esa molécula podría estar asociada con la transmisión de señales de diferenciación y regulación de la proliferación a células T.

Comparando los resultados de los cultivos primarios junto con los de los aislamientos de células de la fracción de baja densidad in vitro y los previamente conocidos sobre los tipos celulares descritos in situ, pensamos que las posibles relaciones entre los tipos celulares in vitro/in situ serían como se detalla en la FIGURA V. Las PTR, población heterogénea que contiene precursores de los macrófagos de tipo 1 y 2 no serían el equivalente in vitro de las IDC intratímicas, como sugirieron PAPIERNIK y col. (1983 y 1986) en ratón, sino el equivalente de los macrófagos tímicos y de los macrófagos aislados de la fracción de baja densidad (FIGURA V). Por otro lado, las DC de los cultivos primarios serían equivalentes a las DC aisladas de la fracción de baja densidad y a las IDC de la médula tímica.



Tras el análisis detallado del contenido celular de los cultivos de estroma tímico de rata, nuestro interés se centró en conocer la capacidad de tales cultivos para reorganizar la citoarquitectura tímica in vivo. Cuatro grandes bloques de resultados resumen esta parte de nuestro trabajo:

1. Con ninguna de las drogas utilizadas, dGuo o CsA, se consiguió que los fragmentos tímicos cultivados, tanto en suspensión como adheridos al sustrato, fueran tolerados cuando se trasplantaban en ratas eutímicas alogénicas.

2. Por el contrario, en combinación singénica los fragmentos no eran rechazados lo mismo que cuando eran trasplantados en ratas "nude" tanto singénicas como alogénicas. Tampoco en estas situaciones se observaron importantes diferencias en el comportamiento in vivo de los fragmentos control y de aquellos que habían sido tratados con las drogas antes mencionadas.

3. Los fragmentos trasplantados en ratas "nude" eran colonizados por elementos hematopoiéticos del huésped (linfocitos, células dendríticas y quizás macrófagos) llegando a organizarse tejidos histológicamente semejantes a los observados en un timo normal.

4. En cualquiera de las situaciones, y aunque el fragmento trasplantado fuera finalmente rechazado, se organizaba un rudimento de estroma tímico que mimetizaba en gran medida el observado in situ, constituyendo un excelente modelo experimental para analizar el origen y continuidad de los componentes celulares del estroma tímico.

Efectivamente, tanto en el caso de los fragmentos cultivados adheridos a la superficie del cultivo como los cultivados en suspensión, e independientemente de que se hubieran incluido o no drogas en el medio de cultivo, los fragmentos trasplantados en ratas eutímicas alogénicas fueron rechazados. Hay, no obstante, ligeras diferencias desde un punto de vista histológico, en cuanto a la evolución del tejido trasplantado en las dos condiciones de cultivo.

Los fragmentos cultivados adheridos al frasco de cultivo desaparecían completamente tres semanas después de ser trasplantados, siendo el área injertada apenas identificable macroscópicamente. Por el contrario, en el caso de los fragmentos cultivados en suspensión sí podía determinarse la zona donde habían sido trasplantados e identificar histológicamente un tejido fibroso. Los distintos resultados podrían deberse simplemente a alteraciones mecánicas inducidas durante el trasplante, mayores en el caso de los cultivados adheridos al sustrato. En

esta situación los fragmentos se colocaban en el extremo de una aguja de jeringuilla cortada. El otro extremo se introducía debajo de la cápsula renal y con un pequeño émbolo se empujaban los fragmentos hasta que aparecían debajo de ella. En el caso de los fragmentos cultivados en suspensión se realizaba un corte en la cápsula renal con un bisturí ahuecándose un pequeño espacio en cuyo interior se empujaban los fragmentos hasta que quedaban completamente dentro del riñón.

El análisis histológico de los fragmentos adheridos al frasco de cultivo demostraba, durante la primera semana tras ser trasplantados, una cierta reorganización del componente epitelial. Si bien a los dos días dichas células mostraban un aspecto enormemente primitivo, similar al observado en el esbozo tímico de embriones de rata de 13 días (VICENTE y ZAPATA, 1991), a los cinco días se había producido una maduración del componente epitelial que ahora mostraba una clara heterogeneidad estructural. Además, el estudio estructural demostraba la existencia de numerosos macrófagos, células de aspecto linfóide y elementos ultraestructuralmente semejantes a las interdigitantes identificadas in situ en la médula tímica. Esta cierta organización del citorretículo tímico es similar, en términos generales, a la observada por KENDALL y col. (1988) en fragmentos tímicos cultivados en suspensión y trasplantados en ratas "nude" alogénicas y singénicas, y será discutido en detalle más adelante.

En el caso de los fragmentos cultivados en suspensión trasplantados en ratas eutímicas el estudio se inició después de una semana y ya en ese momento podía hablarse de un cierto rechazo del tejido trasplantado puesto que con independencia de que se tratara de fragmentos control o tratados con dGuo o CsA, en el área del trasplante había numerosos linfocitos y zonas necróticas donde era difícil identificar las bandas de células epiteliales que habíamos observado cuando los fragmentos eran trasplantados en ratas "nude" o en ratas eutímicas singénicas. No obstante se identificaron células citoqueratina<sup>+</sup> que expresaban moléculas del MHC de clase II del donante, aunque la tinción aparecía muy alterada como consecuencia posiblemente del proceso de rechazo que estaban sufriendo. En cualquiera de los dos tipos de fragmentos utilizados no se observaron restos del tejido a las 2-3 semanas del trasplante.

Parece claro que, a tenor de los resultados ultraestructurales e inmunohistoquímicos, lo que se produce en ambas situaciones experimentales es una cierta reorganización del timo trasplantado a partir de la maduración del componente epitelial del fragmento para inmediatamente iniciarse un rechazo del mismo con independencia de que el fragmento injertado hubiera sido tratado o no con dGuo o CsA. El rechazo de injertos es un proceso inmunológico complejo que se

produce cuando el tejido trasplantado expresa moléculas del MHC que son reconocidas como extrañas por las células del huésped, aunque con algunos tejidos como el tiroides se ha descrito que la mera expresión de estas moléculas no es suficiente para inducir la respuesta (LA ROSA y TALMAGE, 1990). La pregunta a contestar evidentemente es qué células pueden expresar tales moléculas en los fragmentos que consiguientemente podrían ser responsables del rechazo de las mismas y por qué las drogas utilizadas no han impedido el rechazo. Esta incapacidad tendría que ver entonces en el caso de la rata, a diferencia de lo propuesto en otros modelos experimentales, con su ineficacia para eliminar de los fragmentos determinados tipos celulares.

Nuestros resultados inmunohistológicos demuestran que la expresión de moléculas del MHC de clase II donante está básicamente asociada con el epitelio pero también probablemente con células DC y/o macrófagos. Por otra parte, tanto el análisis histológico como el ultraestructural indicaban que aunque en pequeño número las DC/IDC aparecen en el fragmento tanto antes como después del trasplante, aunque en este último caso no sabemos si eran originarias del donante o emigraban desde los tejidos del huésped, un aspecto que posteriormente comentaremos.

Varios autores han estudiado la inmunogenicidad del epitelio trasplantado en este tipo de experimentos. Al igual que lo que muestran nuestros resultados otros autores comprobaron previamente que las células epiteliales de los fragmentos trasplantados mantenían la expresión de moléculas del MHC de clase I y II tanto en ratón (JENKINSON y col., 1982; READY y col., 1984) como en rata (SCHUURMAN y col., 1985 y 1986). Sin embargo, el análisis de la reactividad del huésped hacia el epitelio trasplantado condujo a resultados contradictorios. En ratón el rechazo del fragmento era exclusivamente dependiente de la presencia o no de DC (JENKINSON y col., 1982; READY y col., 1984; BUCKLEY y col., 1988) que, según estos autores, podían ser eliminadas del timo fetal si éste era cultivado en presencia de dGuo. Aparentemente el epitelio no era inmunogénico aunque los autores no dieron explicación alguna sobre este fenómeno. También en ratas "nude" trasplantadas con fragmentos tímicos cultivados en suspensión siguiendo el mismo protocolo aquí utilizado, SCHUURMAN y col. (1986) concluyeron que el haplotipo del epitelio trasplantado carecía de relevancia en la generación del repertorio implicado en el alorreconocimiento antigénico. En este sentido KYEWSKI y col. (1984) demostraron que la expresión de moléculas del MHC de clase II no es una condición suficiente para la presentación antigénica y que, en concreto, la capacidad del epitelio tímico para presentar eficazmente antígenos a las células T era escasa o nula. Por el contrario, las ratas eutímicas rechazan fragmentos tímicos alogénicos cultivados en suspensión como demuestran nuestros resultados y los de otros autores (SCHUURMAN y col., 1985 y 1986). Porqué los fragmentos alogénicos no son rechazados en las ratas

"nude" es algo todavía no suficientemente aclarado y posteriormente volveremos a discutirlo desde otro punto de vista.

La antigenicidad del epitelio trasplantado ha sido por el contrario demostrada en experimentos en los que fragmentos cultivados de timo de rata tratados con 1,35mM o con 4,0mM de dGuo (concentración esta última que elimina por completo la proliferación de linfocitos estimulados con mitógenos) eran rechazados cuando se trasplantaban en ratas eutímicas alogénicas (GEORGIOU y BELLGRAU, 1989). Estos autores consideraron que el rechazo se debía a la persistente inmunogenicidad del epitelio trasplantado. Así, cuando fragmentos de un determinado haplotipo (RT1<sup>a</sup>) cultivados con dGuo 4.0mM se trasplantaban en un huésped alogénico (RT1<sup>c</sup>) que había sido timectomizado, letalmente irradiado y reconstituido con médula ósea singénica (RT1<sup>c</sup>) que no contenía células T, no eran rechazados y el fragmento era colonizado por células provenientes de la médula ósea del huésped (RT1<sup>c</sup>). Si después de más de un año el fragmento era extraído y se trasplantaban de nuevo en un animal del mismo haplotipo que el primer huésped (RT1<sup>c</sup>) pero inmunocompetente, entonces sí había rechazo. Debido a que las células dendríticas del fragmento eran del haplotipo del huésped, el rechazo habría que achacarlo a la fuerte antigenicidad del epitelio donante mantenida durante más de un año (GEORGIOU y BELLGRAU, 1989). No se hace mención, sin embargo, en estos experimentos a que la dGuo, como demuestran nuestros resultados y los de otros autores (SCHURMAN y col., 1982), no tiene significativos efectos sobre los componentes celulares del estroma de los fragmentos cultivados del timo de rata. En este sentido los autores sugieren que durante el año en que los fragmentos están en el huésped inmunoincompetente se produce un "sobrecrecimiento" de las DC del huésped respecto de las DC donantes que pudiesen quedar después del tratamiento con la dGuo. Queda por tanto la duda de que la eliminación de las DC donantes no fuese completa durante el período de cultivo y que el rechazo observado en el huésped inmunocompetente se debiera, al menos en parte, a la presencia de dichas DC.

Si el epitelio no fuese inmunogénico entonces habría necesariamente que pensar en primer lugar en la presencia de DC del donante en el fragmento como sugieren nuestros resultados y los de otros autores (SCHURMAN y col., 1985 y 1986) o, en todo caso, en un posible papel en el proceso de macrófagos que expresasen moléculas del MHC de clase II que quedasen en los fragmentos trasplantados.

En cuanto a la importancia de las DC en el rechazo de aloinjertos las evidencias son numerosas y consiguientemente nuestra discusión se enfocará hacia si en nuestras condiciones

experimentales pueden persistir o no las DC del haplotipo donante en los fragmentos control o tratados con dGuo o CsA antes y después del trasplante.

El trasplante de tejidos con fines terapéuticos o aplicados al estudio de distintos problemas inmunológicos ha conllevado en numerosas ocasiones la utilización de diferentes protocolos tendentes a disminuir la inmunogenicidad del tejido, tratando especialmente de eliminar las DC, potentes estimuladores de las respuestas inmunes alogénicas y los linfocitos responsables de reacciones injerto contra huésped. En algunas ocasiones la pérdida de inmunogenicidad se ha logrado simplemente cultivando el tejido durante cierto tiempo en condiciones estándar (LAFFERTY y col., 1976; SCHULTE-WISERMAN y col., 1978; HONG y col., 1979; LAFFERTY, 1980). En otras ocasiones se han adoptado otras aproximaciones experimentales como el cultivo en condiciones subóptimas a bajas temperaturas (24°C) (JORDAN y CROUSE, 1980; JORDAN y col., 1985a; MARKMAN y col., 1990) o a presión de oxígeno atmosférica (LA ROSA y TALMAGE, 1990; VAN GULIK y col., 1990), la irradiación del tejido después de ser cultivado (WATKINS y SHARP, 1979; SCHURMAN y col., 1982; LAU y col., 1984), la incubación del mismo con anticuerpos anti-Ia y complemento (FAUSTMAN y col., 1981; LEWIS y col., 1989) y el uso de productos selectivamente tóxicos para algunas de las poblaciones celulares presentes en el tejido cultivado. En este sentido se ha apuntado que, in vitro, la dGuo es tóxica para linfocitos y células dendríticas (JENKINSON y col., 1982; OWEN y JENKINSON, 1984; READY y col., 1984; GEORGIU y BELLGRAU, 1989) aunque, como enseguida discutiremos, las evidencias acerca de sus efectos sobre estas últimas son sólo indirectas.

Realmente los efectos de la acción directa de la dGuo han sido estudiados sobre suspensiones celulares de linfocitos periféricos o timocitos (COHEN y col., 1980; KIZAKI y col., 1988; FAIRBANKS y col., 1990) sin que existan en la literatura datos sobre su efecto sobre cultivos primarios de estroma tímico.

Nuestros resultados muestran que la dGuo induce, en un efecto dependiente de dosis (más drástico a concentraciones de 2,5mM y 4,0mM), un retraso en la aparición y el crecimiento de las células que habitualmente crecen en los cultivos primarios control de estroma tímico de rata pero nunca la desaparición selectiva de ninguno de ellos, salvo la masiva mortandad linfoide. La concentración utilizada en la mayoría de nuestros experimentos (1,35mM) es 135 veces mayor que aquella (10µM) a la que la dGuo inhibe la proliferación espontánea de timocitos de ratón. Para inhibir la de otros tipos celulares como timocitos activados con mitógenos, PBL o células B hacen falta concentraciones mucho mayores (300µM) (COHEN y col., 1980). Parece claro entonces que la

aparente especificidad de la droga sobre los timocitos se produce sólo a concentraciones bajas y dicha especificidad desaparece a dosis mayores y, así, en nuestros cultivos la dGuo está actuando probablemente sobre cualquier tipo celular que esté en ciclo. En apoyo de esta idea está el hecho de que cuando se retiraba la droga del medio de cultivo se producía una rápida proliferación de fibroblastos, células que en los cultivos control exhiben un alto índice de proliferación.

Bajo esta perspectiva no es de extrañar que nuestros resultados, tanto en los cultivos de estroma adheridos al frasco de cultivo como en aquellos mantenidos en suspensión, sugieran la presencia de DC, un tipo celular con un bajo nivel de recambio. Así, en los cultivos primarios de estroma mantenidos 5 días con dGuo 1,35mM aparecían pequeñas células redondeadas con una alta expresión de moléculas del MHC de clase II, similares a las existentes en los cultivos control, y que posiblemente corresponden a precursores de células dendríticas. Además, en cultivos mantenidos durante más tiempo con la droga aparecían las típicas DC maduras con largas prolongaciones citoplásmicas y una fuerte expresión de moléculas del MHC de clase II.

Cuando lo que se considera es el contenido de los fragmentos antes de ser trasplantados con ambos métodos de cultivo, los resultados son equivalentes y de nuevo en ningún caso se observaron diferencias sustanciales entre fragmentos control y aquellos tratados con dGuo o CsA, salvo la mayor mortalidad, especialmente de células linfoides, en los fragmentos tratados. SCHUURMAN y col. (1982) comprobaron también que la dGuo no tenía ningún efecto sobre la morfología de los fragmentos provenientes de cultivos en suspensión de timo de rata, argumentando que la droga tenía en realidad sólo efectos sobre la proliferación linfóide, células que al final del período de cultivo y en las condiciones descritas por los autores no estaban presentes en los fragmentos.

En los fragmentos control cultivados adheridos al soporte de cultivo predominan los fibroblastos y macrófagos y el desarrollo epitelial no era grande. Los fragmentos tratados con dGuo 1,35mM contenían mayor cantidad de epitelio que los controles, distribuyéndose particularmente en la periferia pero también hacia el interior en algunas zonas. Además se identificaron morfológicamente macrófagos y células que se asemejaban a las interdigitantes de la médula tímica pero cuya presencia no pudo ser confirmada a microscopía electrónica.

Estos resultados fueron similares cuando los fragmentos se cultivaron en filtros Nucleopore de 0,8µm de tamaño de poro de acuerdo con la técnica descrita por JENKINSON y col. en 1982. (Figs. 245, 246, 247). Estos autores, que utilizaron timo fetal de ratón, no hacen

referencia a la morfología de los fragmentos cultivados, haciendo mención únicamente a la eliminación de las células linfoides y a la posible ausencia de DC en los fragmentos cultivados con dGuo. En nuestro caso hemos comprobado que durante el período de cultivo los fragmentos cultivados con este sistema pierden la citoarquitectura tímica siendo la morfología de los mismos muy similar a la que presentaban los fragmentos adheridos al soporte de cultivo. Al igual que éstos, podía observarse una mayor presencia del componente epitelial en los fragmentos tratados con dGuo que los cultivados en medio control.

En el caso de los cultivos en suspensión los fragmentos están constituidos por una matriz colágena con células epiteliales dispuestas en grupos compactos en el interior o rodeando más o menos por completo el fragmento. En general poseían menor contenido celular que los fragmentos provenientes de fragmentos adheridos al sustrato, consecuencia posiblemente de su menor tamaño y del continuo lavado a que son sometidos los cultivados en suspensión. La presencia de epitelio en este tipo de fragmentos fué confirmada inmunohistoquímicamente mediante anticuerpos anti-queratina. Además, los fragmentos se teñían con el anticuerpo monoclonal His-39, que reconoce in situ epitelio subcapsular y de la médula tímica de rata, pero escasamente con His-38, específico de epitelio cortical.

En los fragmentos cultivados en suspensión también identificamos macrófagos ED1<sup>+</sup> y ED2<sup>+</sup>, mientras que la expresión de antígenos del MHC de clase I y II era especialmente difícil de asignar a tipos celulares concretos porque la calidad de los cortes no lo permitía.

Los datos existentes en la literatura coinciden con los nuestros en señalar la importancia del contenido epitelial de los fragmentos, tanto en ratón (SCHULTE-WISERMAN y col., 1978; JENKINSON y col., 1982; KENDALL y col., 1988) como en rata (SCHUURMAN y col., 1985 y 1986) y en humanos (BALERCIA y col., 1990b) pero ninguno menciona específicamente la existencia o no de DC. Por el contrario, los distintos trabajos asumen, directa o indirectamente, que las DC presentes en los fragmentos después de ser trasplantados provienen exclusivamente del huésped. No obstante, nuestros resultados ultraestructurales, aunque necesitan confirmación, identifican IDC 5 días después del trasplante de los fragmentos, un tiempo posiblemente muy corto, como luego analizaremos con mayor detalle, para que haya habido colonización de DC del huésped.

En experimentos con ratas "nude" trasplantadas con fragmentos tímicos cultivados en suspensión, SCHUURMAN y col. (1987) demuestran una llegada de células dendríticas del huésped al interior de los fragmentos, aunque no demuestran de forma concluyente la ausencia de DC del

donante. En el caso de los ratones, READY y col. (1984) observaban que los lóbulos tímicos de fetos de 14 días cultivados en medio control eran rechazados si se trasplantaban en ratones eutímicos alogénicos pero no si al cultivo se añadía dGuo. Los autores argumentaban que la dGuo, además de eliminar los linfocitos del cultivo, eliminaba también las DC, lo que impedía que el fragmento fuera rechazado. Aunque en ningún momento se verificó en realidad la presencia o ausencia de DC, los autores basaban su hipótesis en el hecho de que si a los ratones trasplantados con lóbulos tímicos cultivados en presencia de dGuo se les inyectaba un determinado número de DC purificadas de bazo de ratones del mismo haplotipo que el fragmento trasplantado, sí se producía el rechazo de los fragmentos (BENSON y col., 1987).

Hay, desde nuestro punto de vista, una explicación alternativa a estos resultados. Evidentemente la presencia de un número suficientemente alto de DC es necesaria para inducir el rechazo de aloinjertos como es perfectamente conocido (revisado por ROSENBERG y SINGER, 1992). Sin embargo parece que el problema en estos experimentos es cuantitativo en relación al número de DC presentes en los fragmentos. Probablemente el número de DC en embriones de 14 días sea muy bajo, aunque sí podrían existir precursores que ya hubieran colonizado el timo en ese momento. Algunos de ellos podrían ser eliminados y tras el trasplante el número de DC maduras sería muy bajo con lo que sólo en ciertas condiciones el tejido sería rechazado. Así, en los experimentos originales (READY y col., 1984) algunos de los animales trasplantados con fragmentos cultivados con dGuo eran rechazados, y en trabajos posteriores del mismo grupo se demostraba que si el número de fragmentos tratados con dGuo que se trasplantaba era alto eran igualmente rechazados, al igual que los cultivados en medio control (BUCKLEY y col., 1988). En nuestro caso el tejido utilizado, timo adulto, contiene presumiblemente un mayor número de DC maduras y menor de precursores, que pudieran ser eliminadas por la droga. Consecuentemente, aparte de que quizás la dGuo no produce los mismos efectos en rata y en ratón, esta explicación podría clarificar la diferencia de resultados observados en ambos modelos experimentales.

Por tanto, si aceptamos que las DC no son eliminadas durante el período de cultivo ni en presencia ni en ausencia de dGuo no es de extrañar que los fragmentos trasplantados en las ratas eutímicas alogénicas sean rechazados independientemente del medio de cultivo utilizado. Una posibilidad que debemos señalar aunque nosotros descartamos es que los fragmentos adheridos al frasco de cultivo, tanto controles como tratados con dGuo, se trasplantaban en el mismo animal (en diferente riñón). Podría pensarse que en estas condiciones el sistema inmune del huésped podría ser activado por las DC de los fragmentos control y ello afectar también a los tratados. Sin embargo, en el caso de los fragmentos cultivados en suspensión donde esta situación de



trasplante no se produce (se operaba sólo un riñón y se injertaban fragmentos o bien control o bien tratados) había igualmente rechazo cuando los fragmentos, tratados o no con dGuo, eran trasplantados en huéspedes eutímicos alogénicos.

Finalmente, y como ya habíamos comentado previamente, los macrófagos tímicos pueden expresar igualmente moléculas del MHC de clase II (NABARRA y PAPIERNIK, 1988), aunque es motivo de controversia si dichas moléculas podrían estar implicadas en los procesos de restricción y tolerancia de los timocitos. Tanto nuestros datos ultraestructurales como los inmunohistológicos demuestran la presencia de macrófagos en los fragmentos trasplantados, de manera que cuando se produce la colonización linfoide de las células epiteliales y la citoarquitectura tímica se ha recuperado en los fragmentos trasplantados cultivados en suspensión, los macrófagos presentan un patrón de tinción similar al encontrado en el timo normal. Entonces, en las áreas corticales hay células que expresan moléculas del MHC de clase II del haplotipo del huésped con una distribución como el que presentan los macrófagos in situ en la corteza de timos normales. El patrón del MHC de clase II del donante en la corteza es casi exclusivamente reticular y por tanto achacable a células epiteliales, si bien es posible que también haya macrófagos que expresen moléculas del MHC de clase II del donante.

Posiblemente se trataría de un problema en la velocidad de recambio entre las poblaciones macrofágicas ED1<sup>+</sup> y ED2<sup>+</sup> del donante y del huésped, puesto que en ambas se ha demostrado, aunque de forma variable, la expresión de moléculas del MHC de clase II (KAMPINGA y ASPINALL, 1990; MURAWSKA y col., 1991). La relativa rápida entrada de macrófagos tanto ED1 como ED2 demostrada inmunohistológicamente en los fragmentos cultivados en suspensión contrasta con otros estudios en los que se realiza un trasplante vascular de timo (KAMPINGA y col., 1990a), donde se produce un rápido recambio, en menos de tres semanas, de las células dendríticas del donante presentes en el timo trasplantado. Sin embargo, el recambio de la subpoblación de macrófagos corticales (ED2<sup>+</sup>) es muchísimo más lento y sólo el 60% de los macrófagos del huésped han sustituido a los del donante después de dos meses y medio de trasplante (KAMPINGA y col., 1990b). Igualmente en experimentos de irradiación y reconstitución con células de médula ósea alogénica y semialogénica se ha encontrado que hay un rápido recambio de la subpoblación de macrófagos ED1<sup>+</sup> y las IDC puesto que a las 4 semanas de la reconstitución estas subpoblaciones presentan un fenotipo del huésped irradiado. Al igual que en el caso anterior, la población ED2<sup>+</sup> del huésped, por el contrario, se mantiene durante más de 20 semanas (MURAWSKA y col., 1991).

Consiguientemente, teniendo en cuenta que la subpoblación ED2<sup>+</sup> puede expresar moléculas del MHC de clase II, que en experimentos con quimeras de irradiación (HOSONO y col., 1987) se ha descrito que un número muy bajo de células de médula ósea son suficientes para generar tolerancia a lo propio y que en experimentos con trasplantes de timo alogénico la pérdida de tolerancia a lo propio se pierde a los 12 meses del trasplante (cuando los macrófagos pueden haber sido recambiados) pero no a los 3 (ISAAK y LAKE, 1982) se podría especular que los macrófagos ED2<sup>+</sup> que expresan moléculas del MHC de clase II del donante presentes incluso en bajo número en los fragmentos trasplantados podrían ser responsables de su rechazo en combinaciones eutímicas.

En los casos comentados las diferencias en la velocidad de recambio podrían deberse a la vía por la que estas células pueden entrar en los trasplantes o en el timo trasplantado o irradiado: en éstos el timo trasplantado se conecta a la circulación sanguínea vía por la que el timo de animal irradiado también recibe el aporte de células, mientras que en el tejido trasplantado podrían venir de la neovascularización producida en el trasplante o del parénquima del riñón.

Con respecto al predominio de células epiteliales que antes comentábamos y que en nuestro caso era especialmente evidente en los fragmentos cultivados con adherencia al sustrato en presencia de dGuo, la mayoría de los trabajos antes mencionados apuntaban igual situación. La explicación a este hecho podría encontrarse en que linfocitos, macrófagos y DC y sus precursores son células móviles que pueden "abandonar" fácilmente los fragmentos o que son eliminados de ellos por el tratamiento mecánico que sufren éstos. En el caso de los fragmentos tratados con dGuo, y a tenor de lo anteriormente mencionado sobre los posibles mecanismos de acción de la droga, fibroblastos, linfocitos y PTR son células que, de acuerdo a nuestros resultados, proliferan enormemente en los cultivos con lo que fácilmente pueden ser "blanco" para la acción de la droga, lo que facilitaría, además, el crecimiento de las colonias de células epiteliales que normalmente quedan rodeadas por bandas de fibroblastos. Consiguientemente, no parece que este predominio epitelial se deba a que las células epiteliales proliferan más en estas condiciones que los otros tipos celulares presentes en los fragmentos. En este sentido, HONG y col. (1979) demostraron que no hay proliferación epitelial en este tipo de cultivos, a tenor de la falta de incorporación de timidina tritiada en dichas células.

Nuestro análisis ultraestructural demostraba la existencia de células epiteliales con diferente grado de diferenciación en los fragmentos a juzgar por su densidad electrónica y grado

de desarrollo de filamentos citoplásmicos y desmosomas, pero siempre se podían encontrar algunas de ellas con características de células muy primitivas. Una similar gradación en cuanto a grado de diferenciación fué señalada por BALERCIA y col. (1990a,b) en fragmentos cultivados de timo humano. Estos autores describen tres tipos de células epiteliales: uno primitivo, otro con gránulos secretores y un tercero con un fuerte desarrollo de filamentos citoplásmicos que denominan por ello epidermioide, y apuntan que en los fragmentos se produce un cierto grado de desdiferenciación que hace difícil asimilar estos tipos celulares a los reconocidos in situ. Los autores, además, especulan con que este primitivismo o desdiferenciación epitelial es debido a la pérdida de los linfocitos ocasionada por las condiciones del cultivo. También, JORDAN y col. (1985a) describen dos tipos básicos de células epiteliales. Uno, minoritario, compuesto por células indiferenciadas y otro, mayoritario, compuesto por células con numerosos desmosomas y filamentos citoplásmicos.

La situación, por otro lado, es comparable, en cierta medida, a la descrita en el timo de ratones SCID donde la ausencia de expresión de determinados marcadores específicos del epitelio medular se restaura tras la colonización del órgano por células inyectadas de médula ósea (SHORES y col., 1991). Si bien la idea, cada día más aceptada, de que la influencia del estroma tímico sobre los timocitos no es unidireccional y que éstos tienen gran importancia para la correcta maduración del estroma, lo cierto es que los datos actuales sólo permiten hacer conjeturas al respecto.

También JORDAN y col. (1985a) describen, en cultivos subóptimos a baja temperatura, de timos fetales de ratón de 14 días dos tipos de células epiteliales que los autores consideran reflejo de la dualidad ecto-endodérmica del origen embriológico del epitelio tímico. De los dos tipos las células más numerosas son poligonales, poco densas a los electrones y forman capas compactas fuertemente unidas por desmosomas que después de trasplantar los fragmentos in vivo en ratones "nude" se asocian con linfocitos organizando una trama reticular histológicamente similar a la de la corteza tímica. Los autores sugieren que dichas células tendrían un origen ectodérmico. Las otras células, densas a los electrones, con interdigitaciones laterales, microvellosidades y, a veces, cilios, se localizaban en el centro del fragmento bordeando la luz de cavidades similares a los quistes epiteliales de la médula tímica. Los autores las consideran primitivas porque se asemejan ultraestructuralmente a las que forman el estroma del rudimento tímico en los ratones nude y, sobre esa base, las consideraron de origen endodérmico.

Por último KENDALL y col. (1988), utilizando un sistema de cultivo en suspensión idéntico al usado en nuestros experimentos, describen ultraestructuralmente en los fragmentos un único tipo de célula epitelial con abundantes tonofilamentos, patentes desmosomas, elevada densidad electrónica y frecuentes gotas lipídicas en su citoplasma. Probablemente estas células representan un estadio de maduración más avanzada que el observado por nosotros en los fragmentos cultivados adheridos al sustrato, a tenor de su mayor densidad electrónica y desarrollo de desmosomas y tonofilamentos. La diferencia puede deberse simplemente a las distintas condiciones de cultivo. No obstante, algunas observaciones ultraestructurales realizadas con nuestros fragmentos cultivados en suspensión confirman, como en los fragmentos adheridos al sustrato, la heterogeneidad del epitelio presente en ellos.

Este hecho viene además avalado por la heterogeneidad observada a nivel inmunohistológico tanto por nosotros como por KENDALL y col. (1988) al reconocer en los fragmentos células epiteliales His-37<sup>+</sup>, His-39<sup>+</sup> y, en menor medida, His-38<sup>+</sup>.

Es notable el predominio de células His-39<sup>+</sup>, de fenotipo medular, frente a las His-38<sup>+</sup> asociadas in situ a la corteza tímica. Ello puede apoyar el mencionado primitivismo o desdiferenciación sufrida por el epitelio en cultivo dado que durante la ontogenia del timo de rata el esbozo epitelial tímico se tiñe mucho antes con His-39 que con His-38 (KAMPINGA y ASPINALL, 1990) aunque, como, luego revisaremos críticamente, KENDALL y col. (1988) consideran que la condición de los fragmentos cultivados en suspensión no es equivalente ni mimetiza la ontogenia del estroma tímico.

La utilización en estos experimentos de CsA con la idea de obviar la inmunogenicidad de los fragmentos cuando se trasplantaban en combinaciones alogénicas se basó en experimentos anteriores que demostraban que, in vivo, la CsA, además de inducir la involución tímica, producía la eliminación de las DC (BESCHORNER y col., 1987; HATTORI y col., 1987; SCHUURMAN y col., 1990), un descenso en la expresión de moléculas del MHC de clase II en células epiteliales (HIRAMINE y col., 1989) y una reducción en la proliferación y diferenciación de timocitos en cultivos de timos fetales de ratón (SIEGEL y col., 1990). No existen datos, sin embargo, hasta nuestro conocimiento, acerca de los efectos de la CsA sobre los componentes de los fragmentos cultivados del timo de rata. En cultivos organotípicos de timo fetal de ratón, utilizando dosis similares a las nuestras, KOSUGI y col. (1989) encuentran que la CsA impide la formación de timocitos inmaduros DP y la de maduros SP, pero no describen si la CsA tiene efectos adicionales sobre las células del estroma en estas condiciones. Por su parte el TBTO es un componente selectivamente

tóxico para los timocitos in vivo e in vitro y, administrado in vivo, produce atrofia tímica, eliminación de linfocitos en bazo y ganglios linfáticos y linfopenia en sangre. El efecto se debe a la muerte de linfocitos intratímicos no afectándose, sin embargo, las células de médula ósea (VOS y col., 1984).

Nosotros no encontramos, en los fragmentos tratados con CsA 3,0µg/ml cultivados en suspensión, que fueron los que posteriormente fueron utilizados para el trasplante, grandes diferencias respecto a las características histológicas e inmunohistoquímicas descritas para los fragmentos control o tratados con dGuo. Es decir, dichos fragmentos estaban compuestos también por células epiteliales y en las tinciones con anticuerpos dirigidos contra MHC de clase II obtuvimos similares resultados a los ya comentados en los fragmentos control y tratados con dGuo. No obstante, en los fragmentos tratados con la dosis mayor (10µg/ml) aparecían numerosas células picnóticas. Por el contrario, con todas las dosis utilizadas de TBTO, la mayoría de las células en el fragmento presentaban un aspecto picnótico incluso después de sólo 4 días de cultivo.

Puede resultar sorprendente que diferentes concentraciones de dGuo y CsA no tengan un reflejo más acentuado en las características histológicas e inmunohistoquímicas de los fragmentos cultivados en suspensión. Creemos que esto puede deberse únicamente a las concentraciones utilizadas, independientemente del producto utilizado. Así, concentraciones excesivamente altas, como ocurre con el TBTO y con la mayor concentración de CsA (10µg/ml), sí producen efectos palpables mientras que con el resto de concentraciones utilizadas, 1,35mM, 2,5mM y 4,0mM para la dGuo y 1,0µg/ml y 3,0µg/ml para la CsA no se observan dichos cambios. Es posible que el protocolo seguido con los fragmentos en suspensión tenga como resultado, como ya se comentó anteriormente, la mayor salida de células del fragmento de forma que este factor sea predominante sobre el efecto de los suplementos presentes en el medio de cultivo, excepto cuando éstos están a concentraciones que implican la muerte de las células.

A tenor de estos resultados es interesante analizar si en el caso de los fragmentos trasplantados en ratas atímicas la condición que se establece es histológica y funcionalmente equivalente a la mostrada por un timo normal. En otras palabras si hay o no una verdadera recuperación del sistema T en las ratas trasplantadas. Los fragmentos cultivados en suspensión en medio control y trasplantados en ratas "nude", tanto en combinación alogénica como singénica, recuperan la citoarquitectura tímica con zonas diferenciadas de corteza y médula después de 6 semanas de trasplante confirmando resultados anteriores en los que se utilizó la misma metodología que la usada en nuestro trabajo (SCHUURMAN y col., 1982, 1985, 1986 y 1987). En el

proceso de recuperación se produce la colonización del fragmento trasplantado por parte de linfocitos y DC del huésped lo que origina un fragmento quimérico que expresa moléculas del haplotipo donante en las células epiteliales mientras que los linfocitos y DC expresan el haplotipo del huésped. Este proceso, además, no se vio afectado por la presencia de dGuo o CsA en el medio de cultivo, lo que está de acuerdo con el hecho de que no observásemos efectos importantes, ni histológicos ni inmunohistoquímicos, de estos productos en los fragmentos cultivados en suspensión.

Los linfocitos presentes en los trasplantes que contribuyen a la recuperación de la histología tímica normal se originan en el huésped puesto que se tiñen exclusivamente con el anticuerpo monoclonal específico de moléculas del MHC de clase I del huésped (U9-F4-B1). Podría pensarse que algunos de los linfocitos presentes en los fragmentos cultivados antes del trasplante pudiesen contribuir a dicha recuperación, puesto que tanto otros autores (JORDAN y CROUSE, 1980) como nosotros observamos la presencia de linfocitos viables incluso dos semanas después del cultivo. Es significativo en este sentido que las ratas "nude" que son inyectadas incluso con un número elevado de timocitos (similar al que hay en un timo normal de una rata joven) no son capaces de reconstituir las áreas T dependientes de sus órganos linfoides periféricos (SCHUURMAN y col., 1985), pero sí lo hacen aquellas que reciben linfocitos periféricos maduros BELL y col. (1987).

Generalmente no hay linfocitos en los trasplantes procesados a las 2 semanas, si bien se distinguen algunos en el tejido conjuntivo que rodea las bandas de células epiteliales. Dichas células se tiñen con los anticuerpos OX-19 (anti-CD5) y R73 (anti-TcR  $\alpha\beta$ ) mientras que el patrón para ER-2 (anti-CD4) y OX-8 (anti-CD8) aun representando básicamente linfocitos podrían incluir también a macrófagos y células NK respectivamente. Pese a estas consideraciones todos los linfocitos a las 4 semanas del trasplante situados en las bandas epiteliales y los presentes en la corteza de los lóbulos a las 6 semanas del trasplante son positivos para CD4 y CD8 a juzgar por los patrones de tinción exhibidos en cortes seriados, lo que sugiere que estos linfocitos serían inmaduros con un fenotipo DP.

Además de la llegada de linfocitos parece producirse también migración de DC del huésped al interior del fragmento, con independencia de la ya discutida presencia de DC del donante, a tenor del patrón de tinción observado con el anticuerpo específico para las moléculas del MHC de clase II del huésped, lo que había sido también previamente observado, en trabajos en rata (BARCLAY y MAYRHOFER, 1981; SCHUURMAN y col., 1986, 1987 y 1989), ratón (READY y col., 1984;

JENKINSON y OWEN, 1990) y en quimeras pollo-codorniz (OHKI y col., 1988). La llegada de dichas células en modelos experimentales equivalentes al aquí presentado no sucede, a tenor de los datos disponibles en la literatura (OLIVER y LE DOUARIN, 1984) antes de una semana, lo que confirma nuestra hipótesis de que en los fragmentos trasplantados hay DC provenientes del donante, puesto que nuestro estudio ultraestructural sugiere su presencia en los fragmentos a los 5 días del trasplante.

A las 2 semanas, estas células del huésped (OX-3<sup>+</sup>) aparecían tanto en las bandas de células epiteliales como en el tejido conectivo que las rodeaba. Puesto que la distribución de macrófagos ED1<sup>+</sup> y ED2<sup>+</sup> afectaba en este momento exclusivamente al tejido conectivo hay que pensar que las células OX-3<sup>+</sup> dentro de las bandas epiteliales correspondían únicamente a DC del huésped. Por el contrario, a 6 semanas, cuando ya se pueden diferenciar claramente en los fragmentos reconstituidos una zona cortical y otra medular, las células positivas para OX-3 aparecen en ambas zonas, coincidiendo el patrón en la corteza con el patrón de tinción de los macrófagos. Este resultado es similar a los descritos en ratas irradiadas y reconstituidas con células de médula ósea alogénica y semialogénica (BARCLAY y MAYRHOFER, 1981; MURAWSKA y col., 1991). En inmunodetecciones realizadas con el anticuerpo 1F119, específico para células dendríticas en rata, MURAWSKA y col. (1991) no encuentran, sin embargo, esta tinción en la zona cortical, por lo que cabe suponer que el marcaje de clase II encontrado por estos autores y por nosotros en áreas corticales sea debido exclusivamente a macrófagos. No podemos descartar, sin embargo, que estas células pudiesen ser realmente dendríticas y que presenten una distribución cortical, anormal si se compara con la situación *in situ* en timo de ratas normales. En este mismo sentido HSIAO y col. (1991) han encontrado recientemente que en timos de ratas posnatales de 1 día hay células dendríticas tanto en corteza como en médula. Desgraciadamente estos autores utilizaron para su identificación el anticuerpo monoclonal TRPM-1 que, en algunos tejidos, tiñe también monocitos y macrófagos, con lo que la existencia de DC necesita una mejor confirmación.

Los resultados presentados demuestran que los fragmentos trasplantados en ratas "nude", en cualquiera de las condiciones experimentales ensayadas, recuperan aparentemente la morfología de un timo normal. Sin embargo, la realidad es que la recuperación de estas ratas atímicas no es total. Por ejemplo algunos lóbulos, a juzgar por el patrón de tinción para citoqueratinas que no muestra una región subcapsular similar a la observada *in situ*. Por otro lado, si las células que expresan moléculas del MHC de clase II del haplotipo del huésped correspondieran realmente a DC y no a macrófagos, la distribución tisular de las primeras diferiría igualmente de la condición normal del timo. No hay tampoco datos acerca de la irrigación sanguínea de los lóbulos ni si

establecen entre ellos algún tipo de barrera. Todo ello podría significar que la diferenciación T que podría tener lugar en estos fragmentos podría no ser equivalente a la que sucede in vivo.

Con respecto a la funcionalidad de estas ratas atímicas injertadas con fragmentos cultivados los datos, no completamente comprendidos, sugieren que la recuperación tampoco es total y podría ser reflejo de la condición quimérica del timo, con células que expresan moléculas del MHC de clase I y clase II del donante en el epitelio cortical y medular y de moléculas del MHC de clase I del donante en linfocitos y de clase II en DC. Nuestros datos apuntan además a la expresión del MHC de clase II donante probablemente en algunos macrófagos y DC.

De los datos recogidos de la literatura se deduce que estos animales recuperan la mayoría de su potencial inmunológico, repoblándose las áreas T dependientes en los órganos linfoides periféricos (HONG y col., 1979; SCHUURMAN y col., 1985, 1986 y 1987) y rechazando aloinjertos cutáneos (SCHUURMAN y col., 1986, 1987 y 1989). Los linfocitos extraídos de los fragmentos adquieren la capacidad de proliferar en respuesta a mitógenos (HONG y col., 1979; SCHUURMAN y col., 1985, 1986 y 1987; HAAR y col., 1988; HAAR y col., 1989), responden en MLR (READY y col., 1984; SCHUURMAN y col., 1986 y 1987; OHKI y col., 1988) y CML (JENSKI y HONG, 1985; HAAR y col., 1988; HAAR y col., 1989) y eliminan células autorreactivas in vivo (YUUKI y col., 1990).

Sin embargo, la reactividad entre células del huésped y células del haplotipo del fragmento trasplantado no son fáciles de entender, habiéndose obtenido resultados contradictorios. Tanto en rata (SCHUURMAN y col., 1985, 1986 y 1987) como en ratón (HONG y KLOPP, 1982; READY y col., 1984; YUUKI y col., 1990; SUZUKI y col., 1989; GEORGIU y BELLGRAU, 1989) se ha demostrado que animales "nude" trasplantados muestran tolerancia hacia el haplotipo del huésped, lo que enfatiza la importancia de las células que colonizan el trasplante desde la médula ósea del huésped en la generación de tolerancia de los linfocitos T generados en el mismo. Este hecho también ha sido comprobado mediante el análisis de las poblaciones T murinas en la periferia. En este caso, los linfocitos  $V_{\beta}3^{+}$  se eliminan si el huésped "nude" expresa Mls-2<sup>a</sup> (YUUKI y col., 1990).

La reactividad de los linfocitos de animales atímicos trasplantados hacia los tejidos del donante ha conducido a resultados contradictorios tanto cuando se ha comparado la situación entre diferentes especies como cuando la valoración se ha realizado in vivo o in situ. En primer lugar los animales trasplantados no rechazan injertos alogénicos de piel de animales con igual haplotipo que el de los fragmentos tímicos cultivados trasplantados (HONG y KLOPP, 1982; JENSKI y



HONG, 1985; JORDAN y col., 1985b; SCHUURMAN y col., 1985, 1986, 1987; BUCKLEY y col., 1988; LE DOUARIN y col., 1989; SCHUURMAN y col., 1989; HOFFMANN y col., 1992).

Cuando el análisis se realiza in vitro los resultados no son tan contundentes. En ratón, en condiciones experimentales similares a las aquí utilizadas, los timocitos muestran tolerancia parcial hacia el haplotipo donante aunque los resultados observados son muy variables. En ocasiones los linfocitos no son tolerantes con las moléculas del MHC de clase I en ensayos de citotoxicidad, pero sí frente a moléculas del MHC de clase II en cultivos mixtos (SUZUKI y col., 1989). En otros casos la tolerancia a moléculas del MHC de clase II es completa en cada animal pero parcial en el sentido de que sólo se da en un tercio de los ratones estudiados (OHKI y col., 1988). Además, las células  $V_{\alpha}6^{+}$ , que en ratones eutímicos que expresan Mls-1<sup>a</sup> están completamente ausentes, son eliminadas sólo parcialmente en ratones "nude" trasplantados con fragmentos tímicos alogénicos de haplotipo Mls-1<sup>a</sup> y, para este mismo superantígeno, BANDEIRA y col. (1992) encuentran que el epitelio no induce ni eliminación clonal ni anergia a los timocitos. Recientemente, HOFFMANN y col. (1992) confirmaban estas diferencias entre la condición in vivo e in vitro en un ensayo en ratón en el que se trasplantaban fragmentos tímicos de embriones de 9-10 días de edad, que presumiblemente estaban compuestos exclusivamente por epitelio ya que en este momento no se ha producido la colonización de células de la médula ósea. En esta situación, mientras los linfocitos generados en los animales trasplantados aceptan injertos de piel del haplotipo del epitelio trasplantado, muestran una alta reactividad contra ese mismo haplotipo en ensayos in vitro.

En el caso de la rata también se ha descrito una atolerancia parcial hacia el haplotipo del donante con resultados similares a los encontrados por HOFFMAN y col. (1992): mientras que los linfocitos aparentemente ignoraron el haplotipo donante expresado las células epiteliales del fragmento trasplantado y el animal no rechazó trasplantes de piel de ese mismo haplotipo, sí mostró reactividad in vitro contra él, si bien no se observó en todos los ensayos realizados (SCHUURMAN y col., 1985, 1986, 1987, 1989).

En nuestro estudio no se han podido realizar experimentos in vitro puesto que la cabo de 6 semanas no ha habido una suficiente reconstitución de las áreas T dependientes de los órganos linfoides periféricos de las ratas atímicas trasplantadas. No obstante, y como ya habían demostrado otros autores (SCHUURMAN y col., 1985, 1986, 1987, 1989) comprobamos que las células epiteliales que expresaban moléculas del MHC de clase I y II del donante, no eran atacadas 6 semanas después del trasplante.

Se han formulado varias hipótesis para explicar este distinto comportamiento in vivo e in vitro, si bien continua sin encontrarse una explicación satisfactoria. Puesto que la reactividad in vitro sugiere que no se ha producido eliminación clonal, se propuso que la alotolerancia observada in vivo hacia las células epiteliales del fragmento trasplantado y hacia los aloinjertos de cutáneos se debía a algún tipo de señal generado in vivo por las propias células epiteliales (SCHUURMAN y col., 1986). Sin embargo, experimentos posteriores de este mismo grupo demostraron la inexistencia de dicha señal puesto que no se podría explicar entonces que ratas "nude" trasplantadas con fragmentos de dos haplotipos diferentes, sí rechazasen injertos de piel de ambos haplotipos (SCHUURMAN y col., 1989). Otras hipótesis, en todo caso no demostradas, proponen la existencia de distintos mecanismos de presentación antigénica para la condición in vivo e in vitro (SCHUURMAN y col., 1989; BOFFMANN y col., 1992) o mecanismos de diferenciación T diferentes entre ratas eutímicas y atímicas injertadas.

El cuarto y último punto que queremos resaltar en este estudio es el hecho de que, con independencia de que los fragmentos sean finalmente rechazados o no, se produce una reorganización histológica temprana del estroma tímico, especialmente de sus componentes epiteliales, que convierte este modelo experimental en otra herramienta de gran utilidad para caracterizar in vivo la maduración y diferenciación del epitelio tímico.

A este respecto queremos analizar con mayor detalle algunos aspectos de esta reorganización histológica de los fragmentos trasplantados. Un primer aspecto a destacar en nuestros resultados es el hecho de que la reconstitución de los fragmentos es mucho más lenta en la condición atímica que en la eutímica. Ello podría deberse al hecho conocido de que el número de precursores linfoides es mucho menor en los animales atímicos, pero también al fenómeno ya comentado de que el tratamiento seguido en los dos métodos de cultivo elimina muchas más células en el caso de los cultivos en suspensión que en el de los cultivados adheridos al sustrato. Ello sugiere, pero no demuestra, la necesidad de una masa epitelial mínima para una eficaz colonización del fragmento, como ya propusieron KENDALL y col. (1988).

No obstante, la idea de que no hay linfocitos en los trasplantes hasta que el epitelio no se ha organizado completamente, propuesta por estos mismos autores, no puede ser críticamente confrontada con los datos ultraestructurales aquí aportados. Así, si bien algunas células presentes ya a los 2 días en los fragmentos trasplantados podrían ser linfocitos, nuestro análisis ultraestructural no excluye la posibilidad de que muchas, si no todas, podrían realmente corresponder a células epiteliales primitivas. En cualquier caso nuestros resultados coinciden

con los de KENDALL y col. (1988) en que la diferenciación epitelial se lleva a cabo a partir de uno o más pocos tipos celulares primitivos que gradualmente diferenciarían a células semejantes a las descritas in situ en el timo adulto.

Con respecto al significado fisiológico que esta reorganización del estroma de los fragmentos indica, KENDALL y col. (1988) consideran que la recuperación de los fragmentos trasplantados no es un proceso histológicamente equiparable al que acontece durante la ontogenia tímica. Estos autores apoyan su hipótesis básicamente en dos aspectos:

a) En primer lugar describen en los fragmentos cultivados, antes de ser trasplantados, un único tipo celular que luego no observan en los primeros días estudiados tras el trasplante.

Nuestros resultados, por el contrario, demuestran una gran semejanza entre las células observadas en los fragmentos antes y después de su trasplante. Además, como también ya se ha comentado, en material procesado exactamente igual que lo llevado a cabo por KENDALL y col. (1988), nosotros hemos detectado ultraestructuralmente una mayor heterogeneidad en el componente epitelial que el encontrado por estos autores. La diferencia entre estos resultados podría deberse al hecho de que en nuestro material la recuperación de los fragmentos es más rápida que en el caso de las ratas atímicas utilizadas por KENDALL y col. (1988) y, consiguientemente, podemos observar antes la heterogeneidad en la ultraestructura de las células epiteliales.

b) En segundo lugar consideran una diferencia fundamental con el desarrollo ontogénico: la colonización linfoide del timo durante la ontogenia es previa a la vascularización, mientras que en el modelo comentado es posterior.

Con independencia de que en su trabajo KENDALL y col. (1988) no demuestran fehacientemente la ausencia de linfocitos en los fragmentos no vascularizados, es conocido que la colonización linfoide del timo embrionario sucede en distintos momentos en diferentes vertebrados, sin relación con la vascularización del órgano puesto que los precursores alcanzan el órgano en unas especies a través de la circulación y en otras a través del mesénquima (MANNING y TURNER, 1976).

A diferencia de estos datos, nuestros resultados apoyan el que una vez trasplantados, tanto los fragmentos control como los tratados con dGuo, se produce una rápida diferenciación del estroma epitelial en un proceso que, en general, mimetiza histológicamente la condición descrita

durante la ontogenia del timo de la rata (VICENTE y ZAPATA, 1991). Algunos de los aspectos que evidencian esta relación con la ontogenia tímica son:

a) A los dos días del trasplante en el fragmento predominan elementos epiteliales muy primitivos cuya morfología recuerda por un lado a la de las células observadas en los fragmentos antes de su trasplante y, por otra, la mostrada por las células epiteliales primitivas que constituyen el esbozo tímico en embriones de rata a los 13 días de vida fetal (VICENTE y ZAPATA, 1991).

b) Ultraestructuralmente el proceso de maduración y diferenciación a partir de estos elementos primitivos se asemeja al que acontece durante la ontogenia del timo de la rata (DUIJKVESTIJN y BARCLAY, 1984; NABARRA y ANDRIANARISON, 1987). Por su parte, KENDALL y col. (1988) niegan esta homología estructural entre los componentes de los fragmentos y el estroma epitelial tímico pero realmente ellos comparan sus resultados con los descritos para las células epiteliales del timo humano, aunque en rata.

c) El análisis inmunohistoquímico demuestra una mayor y más rápida aparición de la tinción para células epiteliales medulares y subcapsulares (células His-39<sup>+</sup>) que corticales (His-38<sup>+</sup>), algo reconocido por KENDALL y col (1988) y descrito también en el timo embrionario de rata (KAMPINGA y ASPINALL, 1990; VICENTE y ZAPATA, resultados sin publicar).

Por último, KENDALL y col. (1988) resaltan en su trabajo la importancia que puede tener la innervación del fragmento para su recuperación histológica. Reconociendo que en todos los procesos regenerativos la reinervación del tejido ha sido considerada crucial, hay que matizar nuevamente algunas aseveraciones de estos autores:

1) En primer lugar las evidencias ultraestructurales de terminales nerviosos en el fragmento trasplantado presentadas por estos autores no son concluyentes en el sentido de que pueden ser realmente nervios ya existentes en el parénquima renal, sin relación por tanto con el injerto.

2) En nuestro estudio se produce una rápida reorganización histológica de los fragmentos sin evidencias ultraestructurales de innervación, y

3) En trasplantes vasculares de timo (KAMPINGA y col., 1990a) estos autores no encontraron diferencias en el desarrollo entre lóbulos conectados a la vascularización e inervados y los que no lo estaban.

## **CONCLUSIONES**

En el presente trabajo hemos pretendido profundizar en el conocimiento de la estructura y función de los componentes del estroma tímico de rata adulta. Para ello se realizaron cultivos primarios que fueron caracterizados en diferentes condiciones experimentales y estudiados in vivo trasplantados en ratas atímicas y eutímicas en combinaciones alogénica y singénica. Las conclusiones obtenidas son las siguientes:

1) Los cultivos primarios de estroma tímico de rata contienen los mismos tipos celulares que los descritos in situ en el órgano, esto es, fibroblastos, células epiteliales, macrófagos y células dendríticas y una población heterogénea de células denominadas PTR. Estas parecen representar el equivalente in vitro de los macrófagos observados in situ y contienen además los precursores de dichas células y, probablemente, de las DC.

2) Los macrófagos aislados directamente del timo muestran semejanzas estructurales con las PTR de los cultivos primarios, proliferando activamente después de 6-7 días de cultivo. Por el contrario, las DC, que no proliferan en cultivo, muestran la típica morfología de las DC de los cultivos primarios.

3) Durante el cultivo, los macrófagos sufren cambios en la expresión de sus marcadores: se produce un incremento del número de células que expresan OX-42, OX-44 y OX-48, mientras que disminuye el número de macrófagos que expresa moléculas del MHC de clase II y Thy-1. En presencia de Con A-SCM aumenta el número de células que expresan estos dos tipos de moléculas mientras que rIL-2 induce un incremento en el número de células que expresan moléculas del MHC de clase II y OX-39.

Por su parte, las DC aisladas expresan fuertemente moléculas del MHC de clase II así como Thy-1, OX-48, OX-44 y, en menor medida, OX-42.

4) La dGuo induce un retraso en la aparición de los diferentes tipos celulares observados en los cultivos de estroma tímico control y la muerte masiva de los timocitos, pero no desaparecen de ellos ningún tipo celular, incluidas las DC, ni se producen cambios en la expresión de los marcadores.

5) Tanto los fragmentos cultivados en suspensión como aquellos adheridos al soporte de cultivo contienen células epiteliales entre masas de tejido conectivo y, en menor medida, macrófagos. Ni las distintas concentraciones de dGuo y CsA utilizadas parecen inducir cambios

importantes en la composición de los fragmentos salvo un mayor desarrollo epitelial y una masica muerte linfoide en el caso de los tratados con dGuo. El análisis morfológico y los datos inmunohistoquímicos sugieren, aunque no demuestran concluyentemente, la presencia de DC en los fragmentos de cualquier condición experimental.

6) Los fragmentos cultivados en suspensión que se trasplantaron en ratas atímicas "nude", tanto en combinación alogénica como singénica, recuperan la citoarquitectura tímica a las 6 semanas del trasplante después de ser colonizados por células linfoides y macrófagos/DC del huésped. El tratamiento con dGuo 1,35mM o 3,0µg/ml de CsA no produjo cambios respecto a los observados en ratas trasplantadas con fragmentos control.

7) El análisis inmunohistoquímico de los fragmentos trasplantados en ratas atímicas demostró una condición quimérica, con expresión de moléculas del MHC de clase I y II del haplotipo donante en las células epiteliales trasplantadas y del haplotipo del huésped en los linfocitos, macrófagos y DC que colonizan los fragmentos. Los datos obtenidos sugieren, pero no demuestran, la presencia de macrófagos y DC donantes en dichos fragmentos.

8) Tanto los fragmentos cultivados en medio control como los cultivados con dGuo 1,35mM que se cultivaron adheridos al sustrato y se trasplantaron en combinación alogénica, pero no aquellos trasplantados en ratas singénicas, fueron rechazados antes de las 3 semanas del trasplante.

9) El análisis ultraestructural de los fragmentos trasplantados en ratas eutímicas demostró que antes de darse rechazo se produce una rápida reorganización del estroma epitelial tímico con neovascularización y presencia de macrófagos y, probablemente, de células interdigitantes.



## **BIBLIOGRAFIA**

ABROMSON-LEEMAN S.R. & DORF M.E. (1991). Extrathymic clonal deletion of self-reactive cells in athymic mice. *J. Immunol.* 147: 1.

AIDA Y., KAKIMOTO K., KAWAKAMI K., CHIBA J., AONO M. & ONOUE K. (1988). Thymic accessory cells required for the increased responsiveness of thymocyte subpopulations to interleukin 1-like monokine in guinea pigs. *Scand. J. Immunol.* 28: 285.

ARDAVIN C. & SHORTMAN K. (1992). Cell surface marker analysis of mouse thymic dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 22: 859.

ARKEMA J.M.S. (1992). Dendritic cells: Ultrastructure and function. Ph.D. Thesis. University of Amsterdam. Holland.

AUSTYN J.M. (1987). Lymphoid dendritic cells. *Immunology* 62: 161.

BACCARINI M., SCHWINZER R. & LOHMANN-MATTHES M.L. (1989). Effect of human recombinant IL-2 on murine macrophage precursors. Involvement of a receptor distinct from the p55 (Tac) protein. *J. Immunol.* 142: 118.

BALERZIA G., ACCORDINI C. & BALERZIA M. (1990a). Characterization of thymus tissue by EM-study. *Biomed. Pharmacother.* 44: 109.

BALERZIA G., ACCORDINI C., FRANCESCHINI F., BLAZSEK I. & OSCULATI F. (1990b). An ultrastructural study of normal human thymic epithelium in primary cultures. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 22: 311.

BANDEIRA A., LARSSON E.L., FORNI L., PEREIRA P. & COUTINHO A. (1987). In vivo activated splenic T cells are refractory to IL-2 dependent growth in vitro. *Eur. J. Immunol.* 17: 901.

BANDEIRA A., COUTINHO A., BURLIN-DEFRAUX O., KHAZAAR I., COLTEY M., JACQUEMART F., LE DOUARIN N. & SABAUN J. (1992). Thymic epithelium induces neither clonal deletion nor anergy to Mls 1<sup>a</sup> antigens. *Eur. J. Immunol.* 22: 1397.

BAÑULS M.P., ALVAREZ A., FERRERO I., ZAPATA A. & ARDAVIN C. (remitido para publicación). Cell surface analysis of rat thymic dendritic cells.

BARBE y col., 1990. Characterization and expression of the antigen presente on resident rat macrophages recognized by monoclonal antibody ED2. Immunobiol. 182: 88

BARCLAY A.N. & MAYRHOFER G. (1981). Bone marrow origin of Ia-positive cells in the medulla of rat thymus. J. Exp. Med. 153: 1666.

BARKA J. & ANDERSON P.J. (1962). Histochemical methods for acid phosphatase using exazonium pararosanilin as coupler. J. Cytochem. 19: 741.

BARTHELEMY H., PELLETIER M., LANDRY D., LAFONTAINE M., PERRAULT C., TAUTU C. & MONTPLAISIR S. (1986). Demonstration of OKT6 antigen on human dendritic cells in culture. Lab. Invest. 5: 440.

BECKER S. & DANIEL E.G. (1990). Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon-gamma on human monocytes and macrophages: Effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production. Cell Immunol. 129: 971.

BELL E.B., SPARSHOTT S.M., DRAYSON M.T. & FORD W.L. (1987). The stable and permanent expansion of functional T lymphocytes in athymic nude rats after a single injection of mature T cells. J. Immunol. 139: 1379.

BELLACOSA A., LAZO P.A., BEAR S.E. & TSCHLIS P.N. (1991). The rat leukocyte antigen MRC OK-44 is a member of a new family of cell surface proteins which appear to be involved in growth regulation. Mol. Cell. Biol. 11: 2864.

BELLER D.I. & UNANUE E.R. (1978). Thymic macrophages modulate one stage of T cell differentiation in vitro. J. Immunol. 121: 1861.

BELLER D.I. & UNANUE E.R. (1980). Ia antigens and antigen presenting function of thymic macrophages. J. Immunol. 124: 1433.

BELLER D.I., KIELY J.M. & UNANUE E.R. (1980). Recognition of macrophage populatons. I. Preferential induction of Ia-rich peritoneal exudates by immunologic stimuli. J. Immunol. 124: 1426.

BELLER D.I. & UNANUE E.R. (1981). Regulation of macrophage populations. II. Synthesis and expression of Ia antigens by peritoneal exudate macrophage is a transient event. *J. Immunol.* 126: 263.

BELLER D.I. & HO K.L. (1982). Regulation of macrophage populations. V. Evaluation of the control of macrophage Ia expression in vitro. *J. Immunol.* 129: 971.

BELLER D.I., SPRINGER T.A. & SCHREIBER R.D. (1982). Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J. Exp. Med.* 156: 1000.

BELOSEVIC M., FINBLOOM D.S., MELTZER M.S. & NACY C.A. (1990). IL-2: A cofactor for induction of activated macrophage resistance to infection. *J. Immunol.* 145: 831.

BENOIST C. & MATHIS D. (1990). Regulation of major histocompatibility complex class-II genes. *Ann. Rev. Immunol.* 8: 681.

BENSON M.T., BUCKLEY G., JENKINSON E.J. & OWEN J.J.T. (1987). Survival of deoxyguanosine-treated fetal thymus allografts is prevented by priming with dendritic cells. *Immunology* 60: 593.

BENVENISTE E.N. & MERRIL J.E. (1986). Stimulation of oligodendroglial proliferation and maturation by interleukin 2. *Nature* 321: 610.

BESCHORNER W.E., NANOUM J.D., MESS A.D., SHINN G.A. & SANTOS G.W. (1987). Cyclosporin A and the thymus. *Immunopathology. Am. J. Pathol.* 126: 487.

BEVAN M. & FINK P. (1978). The influence of thymus H-2 antigens on the specificity of maturing killer and helper cells. *Immunol. Res.* 42: 3.

BIEBER T., RIEGER A., NEUCHRIST C., PRINZ J.C., RIEBER E.P., BOLTZ-NITULESCU G., SCHEINER O., KRAFT D., RING J. & STINGL G. (1989). Induction of FcεR2/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human interleukin 4 and gamma-interferon. *J. Exp. Med.* 170: 309.

BLACKMAN M., KAPPLER J. & MARRACK P. (1990). The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* 248: 1335.

BOFILL M. & JANOSSY G. (1989). The reactivity of macrophages and interdigitating cells with the Fourth Workshop mAb. En: "Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens". Knapp W., Pörken B., eds., Oxford University Press, pg. 916.

BREEL M., MEBIUS R.E. & KRAAL G. (1987). Dendritic cells of the mouse recognized by two monoclonal antibodies. *Eur.J. Immunol.* 17: 1555.

BROOKS G.C., WEBB P.J., ROBINS R.A., ROBINSON G., BALDWIN R.W. & FESTING M.F.W. (1980). Studies on the immunohistology of *rnu/rnu* "nude" rats with congenital aplasia of the thymus. *Eur. J. Immunol.* 10: 58.

BROX L., NG A., POLLOCK E. & BEICH A. (1984). DNA strand breaks induced in human T-lymphocytes by the combination of deoxyadenosine and deoxycoformycin. *Cancer Res.* 44: 934.

BUCKLEY G., BENSON M.T., JENKINSON E.J. & OWEN J.J.T. (1988). Factors affecting the acceptance of deoxyguanosine-treated thymus allografts. *Transplantation* 45: 202.

CARDING S.R., HAYDAY A.C. & BOTTOMLY K. (1991). Cytokines in T-cell development. *Immunol. Today* 12: 239.

CEREDIG R., LOWENTHAL J.W., NABHOLD M. & MAC DONALD H.R. (1985). Expression of interleukin-2 receptors as a differentiation marker on intrathymic stem cells. *Nature* 314: 98.

CEREDIG R. (1988). Differentiation potential of 14-day fetal mouse thymocytes in organ cultures. Analysis of CD4/CD8-defined single-positive and double-negative cells. *J. Immunol.* 141: 355.

COHEN A., LEE W.W.J., DOSCH H.-M. & GELFAND E.W. (1980). The expression of deoxyguanosine toxicity in T lymphocytes at different stages of maturation. *J. Immunol.* 125: 1578.

COHEN S., BERERIH S., DARDENNE M. & BACH J.F. (1984). Feedback regulation of the secretion of a thymic hormone (Thymulin) by human thymic epithelial cells in culture. *Thymus* 8: 109

COHN Z.A. & STEINMAN R.M. (1982). Phagocytosis and fluidphase pinocytosis. En: "Membrane Recycling". Ciba Foundation Symposium. Vol. 92, p15. Pitman, London.

COLIC M., JOVANOVIĆ S., MITROVIĆ S. & DUJIC A. (1989a). Immunohistochemical identification of six-defined subsets of the rat thymic epithelial cells. *Thymus* 13: 175.

COLIC M., MITROVIĆ S. & DUJIC A. (1989b). Phenotypization of rat thymic epithelial cells in primary culture. En: "Abstracts of the 7th. International Congress of Immunology". Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. Workshop 37-9.

COLIC M., POPOVIĆ L.J., GASIĆ S., DRAGOJEVIĆ-SIMIC V., MILICEVIĆ N.M., MATANOVIĆ D. & DUJIC A. (1990). Immunohistochemical characterization of rat thymic non-lymphoid cells. II. Macrophages and granulocytes defined by monoclonal antibodies. *Immunology* 69: 416.

COLIC M., POPOVIĆ L., GASIĆ S., DRABEK D. & DUJIC A. (1991). Primary culture of rat thymic non-lymphoid cells: Influence of culture time on the expression of macrophage differentiation antigens defined by monoclonal antibodies. *Thymus* 18: 243.

COWING C., SCHWARTZ B.D. & DICKLER H.B. (1979). Macrophage Ia antigens. I. Macrophage populations differ in their expression of Ia antigens. *J. Immunol.* 120: 378.

CRISPE I.N., MOORE M.W. & HUSMANN L.A. (1987). Differentiation potential of subsets of CD4-CD8- thymocytes. *Nature* 329: 336.

CROUSE D.A., TURPEN J.B. & SHARP J.G. (1985). Thymic non-lymphoid cells. *Surv. Immunol. Res.* 4: 120.

CROWLEY M., INABA K., WITMER-PACK M. & STEINMAN R.M. (1989). The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell. Immunol.* 118: 108.

DALLOUL A.H., FOURCADE C., DEBRE P. & MOSSALAYI M.D. (1991). Thymic epithelial cell-derived supernatants sustain the maturation of human prothymocytes: involvement of interleukin 1 and CD23. *Eur. J. Immunol.* 21: 2633.

DAMOISEAUX J.G.M.C., DOPPEA, BELEN R.H.J. & DIJKSTRA C.D. (1989). Rat bone marrow and monocyte cultures: influence of culture time on the expression of macrophage differentiation antigens. *J. Leuk. Biol.* 46: 246.

DAMOISEAUX J.G.M.C. (1991). Macrophage heterogeneity in the rat. Ph.D. Thesis. Free University of Amsterdam. Holland.

DE MAAGD R.A., MACKENZIE W.A., SCHURMAN H.-J., RITTER M.A., PRICE K.M., BROEKHUIZEN R. & LATER L. (1985). The human thymus microenvironment: heterogeneity detected by monoclonal anti-epithelial cell antibodies. *Immunology* 54: 745.

DIJKSTRA C.D., DÖPP E.A., JOLING P. & KRAAL G. (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54: 589.

DOUGLAS-JONES A., NELSON J., JANSEN V. & MILLER TH. (1981). Characterization of the (runnz) nude rat. Morphological characteristics of the lymphoid system. *AJERAK* 59: 227.

DUIJVESTIJN A.M. & HOEFSEMIT E.C.M. (1981). Ultrastructure of the rat thymus: The micro-environment of T-lymphocyte maturation. *Cell Tissue Res.* 218: 279.

DUIJVESTIJN A.M., SCHUTTE R., KHOLER Y.G., KORN C. & HOEFSEMIT E.C.M. (1983). Characterization of the population of phagocytic cells in thymic cell suspensions. *Cell Tissue Res.* 231: 313.

DUIJVESTIJN A.M. & BARCLAY A.M. (1984). Identification of the bone marrow-derived Ia positive cells in the rat thymus: morphological and cytochemical study. *J. Leuk. Biol.* 36: 561.

DUIJVESTIJN A.M., SMINIA T., KHOLER Y.G., JANSE E.M., HOEFSEMIT E.C.M. (1984). Ontogeny of the rat thymus microenvironment: development of the interdigitating cell and macrophage populations. *Dev. Comp. Immunol.* 8: 451

DUSSANT-DEMYLLE y col. (1991). Thymic accesory cell complexes in vitro and in vivo: morphological study. *Cell Tissue Res.* 263: 293.

EL ROUBY S., PRAZ F., HALEWACHS-MECARELLI L. & PAPIERNIK M. (1985). Thymic reticulum in mice. IV. The rosette formation between phagocytic cells of the thymic reticulum and cortical type thymocytes is mediated by complement receptor type three. *J. Immunol.* 134: 3625.

EL ROUBY S., EZINE S. & PAPIERNIK M. (1988). Repopulation potential of thymocytes forming rosettes with phagocytic cells of the reticulum. *Scand. J. Immunol.* 27: 433.

ESHEL I., SAVION N. & SROHAM J. (1990). Analysis of thymic stromal cell subpopulations grown in vitro on extracellular matrix in defined medium. *J. Immunol.* 144: 1554.

FAIRBANKS L.D., TADDEO A., DULEY J.A. & SIMMONDS H.A. (1990). Mechanisms of deoxyguanosine lymphotoxicity. Human thymocytes, but not peripheral blood lymphocytes accumulate deoxy-GTP in conditions simulating purine nucleoside phosphorylase deficiency. *J. Immunol.* 144: 485.

FALK L.A., WAHL L.M. & VOGEL S.N. (1988). Analysis of Ia antigen expression in macrophages derived from bone marrow cells cultured in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or macrophage colony stimulation. *J. Immunol.* 140: 2652.

FAUSTMAN D., HAUPTFELD V., LACY P. & DAVIE J. (1981). Prolongation of murine islet allograft survival by the pretreatment of islets with antibody directed to Ia determinants. *Proc. Nat. Acad. Sci.(USA)* 78: 5156.

FESTING M.F.W., MAY D., CONNORS T.A., LOVELL D. & SPARROW S. (1978). An athymic nude mutation in the rat. *Nature* 274: 365.

FEUTREN G. (1989). Cyclosporin A: recent developments in the mechanism of action and clinical application. *Curr. Opin. Immunol.* 2: 239.

FISHER A.G., LARSSON L., GOFF L.K., RESTALL D.E., HAPPERFIELD L. & MERKENSCHLAGER M. (1990). Human thymocyte development in mouse organ cultures. *Inter. Immunol.* 2: 571.

FOSSUM S., SMITH M.E., BELL E.B. & FORD W.L. (1980). The architecture of rat lymph nodes. III. The lymph nodes and lymph-borne cells of the congenitally athymic nude rat (rnu). *Scand. J. Immunol.* 12: 421.



FOSSUM S., SMITH M.E. & FORD W.L. (1983). The recirculation of T and B lymphocytes in the athymic nude rat. *Scand. J. Immunol.* 17: 551.

FOSSUM S. (1984). Characterization of Ia+ non-lymphoid cells in peripheral lymph from congenitally athymic nude rats. *Scand. J. Immunol.* 19: 49.

FOSSUM S., ROLSTAD B. & FORD W.L. (1984). Thymus independence, kinetics and phagocytic ability of interdigitating cells. *Immunobiol.* 168: 403.

FOWLKES B.J., EDISON L., MATHIESON B.J. & CHUSED T.M. (1985). Early T lymphocyte differentiation in vivo of adult intrathymic precursors. *J. Exp. Med.* 162: 802.

FRANKE W.W., SCHMID E. & MOLL R. (1982). The intermediate filament cytoskeleton in tissues and in cultured cells: differentiation specificity of expression of cell architectural elements. En: "Human Carcinogenesis" C.C. Harris and M.N. Autrup eds., (New York: Academic Press) pg. 261.

FREUDENHANT P.S. & STEINMAN R.M. (1990). The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7698.

FUCHS E. & GREEN H. (1980). Changes in keratin expression during terminal differentiation of keratinocyte. *Cell* 19: 1033.

GAO E.-K., LO D., CHENEY R., KANAGAWA O. & SPRENT J. (1988). Abnormal differentiation of thymocytes in mice treated with cyclosporin A. *Nature* 336: 176.

GEORGIOU H.M. & BELLGRAU D. (1989). Persistent immunogenicity of rat thymic epithelium. *Transplantation* 48: 302.

GIROLOMONI G., SIMON J.C. & BERGSTRESSER P.R. (1990). Freshly isolated spleen dendritic cells and epidermal Langerhans cells undergo similar phenotypic and functional changes during short term culture. *J. Immunol.* 145: 2820.

HAAR J.L., TAUBENBERGER J.K. & DOANE L. (1988). Augmentation of pre- and post-thymic T-lymphocyte responses in thymic epithelial cell grafted nude mice. *Exp. Hematol.* 16: 631.

HAAR J.L., TAUBENBERGER J.K., DOANE L. & KENYON N. (1989). Enhanced in vitro bone marrow cell migration and T-lymphocyte responses in aged mice given subcutaneous thymic epithelial cell grafts. Mech. Ageing Dev. 47: 207.

HABU S., OKUMURA S., DIAMANSTEIN T. & SHEVACH E.M. (1985). Expression of interleukin 2 receptor on murine fetal thymocytes. Eur. J. Immunol. 15: 456.

HALLORAN P.F., COCKFIELD S.M. & MADRENAS J. (1989). The molecular immunology of transplantation and graft rejection. Immunol. Aller. Clin. 9: 1

HANCOCK W.W., DORD R.H., COLBY A.J., DIAMANSTEIN T., RICKLES F.R., DIJSTRA C., HOGG N. & TILNEY N.L. (1987a). Identification of IL-2R+ T cells within rejection cardiac allografts, and comparison of the effects of treatment with anti-IL-2R monoclonal antibody or cyclosporin. J. Immunol. 138: 164.

HANCOCK W.W., MULLER W.A. & COTRAN R.S. (1987b). Interleukin 2 receptors are expressed by alveolar macrophages during pulmonary sarcoidosis and are inducible by lymphokine treatment of normal human lung macrophages, blood monocytes and monocyte cell lines. J. Immunol. 138: 185.

HATTORI A., KUNZ H.W., GILL III T.J. & SHINOZUKA H. (1987). Thymic and lymphoid changes and serum immunoglobulin abnormalities in mice receiving cyclosporine. Am. J. Pathol. 128: 111.

HAYNES B.F. (1990). Human thymic epithelium and T cell development: current issues and future directions. Thymus 16: 143.

HE H., NAQUET P., CAILLOT D. & PIERNES M. (1991). Thy-1 supports adhesion of mouse thymocytes to thymic epithelial cells through a Ca<sup>2+</sup>-independent mechanism. J. Exp. Med. 173: 515.

HEMLER M.E. (1988). Adhesive protein receptors on hemopoietic cells. Immunol. Today 9: 109.

HERRMAN F., CANNISTRA S.A., LEVINE H. & GRIFFIN J.D. (1985). Expression of interleukin-2 receptors and binding of interleukin-2 by g-interferon induced human leukemic and normal monocytic cells. J. Exp. Med. 162: 1111.

HIRAMINE C., HOJO K., KOSETO M. & ITOH M. (1989). The effect of cyclosporin on murine thymic epithelial cells-an immunohistochemical study. *Thymus* 14: 213.

HOFFSMIT E.C.M., KAMPERDIJK E.W.A., HENDRICKS H.R., BEELEN R.H.J. & BALFOUR B.M. (1980). Lymph node macrophages. En: "The Reticuloendothelial System" vol.1, I. Carr & W.T. Daems eds. Plenum Publishing Corporation. pg. 417.

HOFFMANN M.W., ALLISON J. & MILLER J.F.P.A. (1992). Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2526.

HONG R., SCHULTE-WISSERMAN H., JARRETT-TOTH E., HOROWITZ S.D. & MANNING D.D. (1979). Transplantation of cultured thymic fragments. II. Results in nude mice. *J. Exp. Med.* 149: 398.

HONG R. & KLOPP R. (1982). Transplantation of cultured thymus fragments. III. Induction of allotolerance. *Thymus* 4: 91.

HOSONO M., HOSOKAWA T., KINA T. & KATSURA Y. (1987). Neonatal tolerance induction in the thymus to MHC-class II-associated antigens. III. Significance of hemopoietic stem cells for induction and maintenance of MLS tolerance by continous supply of tolerance-inducing nonlymphocytes. *Cell Immunol.* 108: 162.

HOUGEN H.P. & KLAUSEN B. (1984). Effects of homoizogosity of the nude (rmu) gene in an inbred strain of rats: Studies of lymphoid and non-lymphoid organs in different age groups of nude rats of LEW background at a stage in the gene transfer. *Lab. Animals* 18: 7.

HOUGEN H.P. & KLAUSEN B. (1987). The thymus reconstituted nude rat: Lymphocyte subpopulations and immunological characteristics. *Thymus* 10: 207.

HOUGEN H.P., KLAUSEN B., STENVANG J.P., KRAEMER J. & RYGAARD J. (1987). Effects of the xenogeneic, allogeneic and syngeneic thymus grafts on lymphocyte populations in peripheral lymphoid organs of the nude rat. *Lab. Animals* 21: 103.

HOUGEN H.P. (1988). The untreated and immunologically reconstituted nude rat: immunobiology and application. Ph.D. Thesis, APMIS 21.

HOWE R.C., LOWENTAL J.W. & MACDONALD R. (1986). Role of interleukin 1 in early T cell development: Lyt2-L3T4-thymocytes bind and respond in vitro to recombinant IL-1. J. Immunol. 137: 3195.

HSIAO L., TAKAHASHI K., TAKEYA M. & ARAO T. (1991). Differentiation and maturation of macrophages into interdigitating cells and their multicellular complex formation in the fetal and postnatal rat thymus. Thymus 17: 219.

HUGO P., BOYD R., WAANDERS G.A., PETRIE H.T. & SCOLLAY R. (1990). Timing of deletion of autorreactive V $\beta$ 6+ cells and down-modulation of either CD4 or CD8 on phenotypically distinct CD4+8+ subsets on thymocytes expressing intermediate or high levels of T cell receptor. Int. Immunol. 3: 265.

HUISKAMP R., DAVIDS J.A.G. & VAN EWIJK W. (1988). The effect of graded doses of fission neutrons of X rays on the stromal compartment of the thymus in mice. Radiat. Res. 113: 25.

HUME D.A., ROBINSON A.P., MACPHERSON G.G. & GORDON S. (1983). The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. J. Exp. Med. 158: 1522.

HÜNING T., WALLNY H.-J., HASTLEY, J.K., LAWETZKY A. & TIEFENTHALER G. (1989). A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. J. Exp. Med. 169: 73.

INABA K., INABA M., KINASHI T., TASHIRO K., WITMER-PACK M., CROWLEY M., KAPLAN G., VALINSKI J., ROMANI N., IKEHARA S., MURAMATSU S., HONJO T. & STEINMAN R.M. (1988). Macrophages phagocytose thymic lymphocyte with productively rearranged T cell receptor  $\alpha$  and  $\beta$  genes. J. Exp. Med. 168: 2279.

ISAAK D.D. & LAKE J.P. (1982). Loss of tolerance to thymus-donor strain antigens in nude mice bearing long-term allogeneic thymus graft. Thymus 4: 265.

ITOH T. (1979). Establishment of an epithelial cell line from rat thymus. *Am. J. Anat.* 156: 99.

JAYARAM Y., BUCKLE A.M. & HOGG N. (1989). The Fc receptor, FcR1, and other activation molecules on human mononuclear phagocytes after treatment with interferon-g. *Clin. Exp. Immunol.* 75: 414.

JENKINSON E.J., OWEN J.J.T. & ASPINALL R. (1980). Lymphocyte differentiation and major histocompatibility complex antigen expression in the embryonic thymus. *Nature* 284: 177.

JENKINSON E.J., VAN EWIJK W. & OWEN J.J.T. (1981). Major histocompatibility complex antigen expression on the epithelium of the developing thymus in normal and nude mice. *J. Exp. Med* 153: 280.

JENKINSON E.J., FRANCHI L.L., KINGSTON R. & OWEN J.J.T. (1982). Effect of deoxyguanosine on lymphopoiesis in the developing thymus rudiment in vitro: application in the production of chimeric thymus rudiment. *Eur. J. Immunol.* 12: 583.

JENKINSON E.J. & OWEN J.J.T. (1990). T-cell differentiation in thymus organ cultures. *Seminar. Immunol.* 2: 51.

JENSKI L.J. & HONG R. (1985). Transplantation of cultured thymus fragments. IV. H-2 recombinant donors. *J. Immunol.* 135: 947.

JORDAN R.K. & CROUSE D.A. (1980). Non-lymphoid cells and intrathymic T cell differentiation. En: "Development and Differentiation of Vertebrates Lymphocytes". Horton J.D. ed., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pg. 47.

JORDAN R.K., BENTLEY A.L., PERRY G.A. & CROUSE D.A. (1985a). Thymic epithelium. I. Lymphoid-free organ cultures grafted in syngeneic intact mice. *J. Immunol.* 134: 2155.

JORDAN R.K., ROBINSON J.H., HOPKINSON N.A., HOUSE K.C. & BENTLEY A.L. (1985b). Thymic epithelium and the induction of transplantation tolerance in nude mice. *Nature* 314: 454.

KABEL P.J., DE HAAN-MEULMAN M., VOORBIJ H.A.M., KLEINGELD M., KNOL E.F. & DREXHAGE H.A. (1989). Accessory cells with a morphology and marker pattern of dendritic cells can be obtained from elutriator-purified blood monocyte fractions. An enhancing effect of metrizamide in this differentiation. *Immunobiol.* 179: 395.

KAMPINGA J., BERGES S., BOYD R.L., BREKHELMANS P., COLIC M., VAN ENIJK W., KENDALL M.D., LADYMAN H., NIEUWENHUIS P., RITTER M.A., SCHUURMAN H.-J. & TOURNEFIER A. (1989). Thymic epithelial antibodies: immunohistological analysis and introduction of nomenclature. *Thymus* 13: 165.

KAMPINGA J., SCHUURMAN H.-J., POL G.H., BARTELS H., BROEKHUIZEN R., VAESSEN L.M.B., TIELEN F., ROZING J., ROSER B., ASPINALL R. & NIEUWENHUIS P. (1990a). Vascular thymus transplantation in rats. Technique, morphology and function. *Transplantation* 4: 669.

KAMPINGA J., NIEUWENHUIS P., ROSER R. & ASPINALL R. (1990b). Differences in turnover between thymic medullary dendritic cells and a subset of cortical macrophages. *J. Immunol.* 145: 1659.

KAMPINGA J. & ASPINALL R. (1990). Thymocyte differentiation and thymic micro-environment development in the fetal rat thymus: an immunohistological approach. En: "Thymus Update" vol.3, M.D. Kendall & M.A. Ritter eds. Harwood Academic Publishers. pg. 149.

KAPPLER J.W., ROEHM N. & MARRACK P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49: 273.

KENDALL M.D., SCHUURMAN H.-J., FENTON J., BROEKHUIZEN R. & KAMPINGA J. (1988). Implantation of cultured thymic fragments in congenitally athymic (nude) rats. Ultrastructural characteristics of the developing microenvironment. *Cell Tissue Res.* 254: 283.

KINGSTON R., JENKINSON E.J. & OWEN J.J.T. (1985). A single stem cell can recolonize an embryonic thymus producing phenotypically distinct T-cell populations. *Nature* 317: 811.

KISIELOW P., LEISERSON W. & VON BOEHMER H. (1984). Differentiation of thymocytes in fetal organ cultures: analysis of phenotypic change accompanying the appearance of cytolytic and interleukin-2 producing cells. *J. Immunol.* 133: 1117.

KISIELOW P., BLUTHMANN H., STAERZ U., STEINMETZ H. & VON BOEHMER H. (1988). Tolerance in T cell receptor transgenic mice involves deletion of non-mature CD4+CD8+ thymocytes. *Nature* 333: 742.

KIZAKI H., SHIMADA H., OHSAKA F. & SAKURADA T. (1988). Adenosine, deoxyadenosine, and deoxyguanosine induce DNA cleavage in mouse thymocytes. *J. Immunol.* 141: 1652.

KNIGHT S.C., BALFOUR B.M., O'BRIEN J., BUTTIFANT L., SUMERSKA T. & CLARKE J. (1982). Role of veiled cells in lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol.* 12: 1057.

KNIGHT S.C., FARRANT J., BRYANT A., EDWARDS A.J., BURMAN S., LEVER A., CLARKE J. & WEBSTER D.B. (1986). Non-adherent, low density cells from human peripheral blood contain dendritic cells and monocytes, both with veiled morphology. *Immunology* 57: 595.

KNIGHT S.C., FRYER P., GRIFFITHS S. & HARDING B. (1987). Class II histocompatibility antigens on human dendritic cells. *Immunology* 61: 21.

KOSUGI A., ZUÑIGA-PFLUCKER J.C., SHARROW S.O., KRUISBEEK A.M. & SHEARER G.M. (1984). Effect of cyclosporin A on lymphopoiesis. II. Developmental defects of immature and mature thymocytes in fetal organ cultures treated with cyclosporin A. *J. Immunol.* 143: 3134.

KOSUGI A., SHARROW S.O. & SHEARER M. (1989). Absence of mature T cells in thymus and periphery of bone marrow transplanted mice treated with cyclosporin A. *J. Immunol.* 142: 3026.

KOYASU S., YODOI J., NIKAIIDO T., TAGAYA Y., TANIGUCHI Y., HONJO T & YAHARA L. (1986). Expression of interleukin 2 receptors on interleukin 3 dependent cell lines. *J. Immunol.* 136: 984.

KRUISBEEK A.M., FULTZ M.J., SHARROW S.O., SINGER A. & MOND J.J. (1983). Early development of the T cell repertoire. *In vivo* treatment of neonatal mice with anti-Ia antibodies interferes with the differentiation of I-restricted T cells but not K/D restricted T cells. *J. Exp. Med.* 157: 1932.

KYIEWSKI B.A., FATHMAN C. & KAPLAN H. (1984). Intrathymic presentation of circulating non-major histocompatibility complex antigens. *Nature* 308: 196.

KYIEWSKI B.A., FATHMAN C.G. & ROUSE R.V. (1986). Intrathymic presentation of circulating non-MHC antigens by medullary dendritic cells. An antigen-dependent microenvironment for T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 163: 231.

KYIEWSKI B.A. (1987). Seeding of thymic microenvironments defined by distinct thymocyte-stromal cell interactions is developmentally controlled. *J. Exp. Med.* 166: 520.

LAFFERTY K.J., BOOTES A., DART G. & TALMAGE D.W. (1976). Effect of organ culture on the survival of thyroid allografts in mice. *Transplantation* 22: 138.

LAFFERTY K.J. (1980). Immunogenicity of foreign tissues. *Transplantation* 29: 179.

LAKE J.P., PIERRA C.W., KENNEDY J.D. (1991). T cell receptor expression by T cells that mature extrathymically in nude mice. *Cell Immunol.* 135: 259.

LANDRY D.L., LAFONTAINE M., COSSETTE M., BARTHELEMY H., CHARTRAND C., MONTPLAISIR S. & PELLETIER M. (1988). Human dendritic cells. Characterization, isolation and functional assays. *Immunology* 65: 135.

LANDRY D.L., LAFONTAINE M., BARTHELEMY H., PAQUETTE N., CHARTRAND C., PELLETIER M. & MONTPLAISIR S. (1989). Human thymic dendritic cell-thymocyte association: ultrastructural cell phenotype analysis. *Eur. J.Immunol.* 19: 1855.

LANDRY D.L., DOYON L., POUDRIER J., LAFONTAINE M., PELLETIER M. & MONTPLAISIR S. (1990). Accessory function of human thymic dendritic cells in Con A-induced proliferation on autologous thymocyte subsets. *J. Immunol.* 144: 836.

LA ROSA F.G. & TALMAGE D.W. (1990). Major histocompatibility complex antigen expression in parenchymal cells of thyroid allografts is not by itself sufficient to induce rejection. *Trnasplantation* 49: 605.

LAU H., REEMTSMA K. & HARDY M.A. (1984). Prolongation of rat islet allograft survival by direct ultraviolet irradiation of the graft. *Science* 223: 607.



LE DOUARIN N.M., CORBEL C., MARTIN C., COLTEY M. & SALAUN J. (1989). Induction of tolerance by embryonic thymic epithelial grafts in birds and mammals. En: "Cold Spring Harbor Laboratory Press". pg. 777.

LEPESANT H., REGGIO H., PIERRES M. & NAQUET P. (1990). Mouse thymic epithelial cells interact with and select a CD3lowCD4+CD8+ thymocyte subset through an LFA-1-dependent adhesion-de-adhesion mechanism. *Inter. Immunol.* 2: 1021.

LESLEY J., SHULTE R. & HYMAN R. (1988). Kinetics of thymus repopulation by intrathymic progenitors after intravenous injection: Evidence for successive repopulation by an IL-2R+, Pgp1+ and by an IL-2R- Pgp1+ progenitor. *Cell Immunol.* 117: 378.

LEWIS R.E., BRACKIN M.N., CRUSE J.M., BRACKIN B.T., RAJU S., CRAWFORD M., KRUEGER R., KIRCHNER K. & BOWER J. (1989). Anti-Class II antibody production prolongs renal allograft survival. *Pathol. Immunopathol. Res.* 8: 287.

LOBACH D.F. & HAYNES B.F. (1987). Ontogeny of the thymus during fetal development. *J. Clin. Immunol.* 7: 81.

LOOR P. (1979). Mouse thymus reticulo-epithelial (RE) cells in vitro: isolation, cultivation, and preliminary characterization. *Immunology* 37: 157.

LORENZ R.G. & ALLEN P.M. (1989). Thymic cortical epithelial cells can present self-antigens in vivo. *Nature* 337: 560.

LUPIN D., IWAKI H., MASUDA A., IMAMURA M. & UEDE T. (1989). The preferential binding of immature thymocytes to a rat thymic epithelial cell line. *Thymus* 14: 243.

MACPHERSON G.G. (1989). Properties of lymph-borne (veiled) dendritic in culture. I. Modulation of phenotype, survival and function: partial dependence on GM-CSF. *Immunology* 68: 102.

MACPHERSON G.G., FOSSUM S. & HARRISON B. (1989). Properties of lymph-borne (veiled) dendritic cells in culture. II. Expression of the IL-2 receptor: role of GM-CSF. *Immunology* 68: 108.

MALKOVSKY M., LOVELAND A., NORTH P., ASHERON G.L., GAO L., WARD P. & FRIERS W. (1987). Recombinant interleukin 2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* 325: 262.

MANNING M.J. & TURNER R.J. (1976). *Comparative Immunobiology*. Blackie, Glasgow & London, pag. 184

MARKMAN J.F., TOMASZEWSKI J., POSSELT A.M., LEVY M.M., WOERLE M., BARKER C.F. & NAJI A. (1990). The effect of islet cell culture in vitro at 24°C on graft survival and MHC antigen expression. *Transplantation* 49: 272.

MARTINEZ, A.C., MARCOS, M.A.R., PEREIRA, P., MARQUEZ, C., TORIBIO, M., DE LA HERA, A., CAZENAVE, P.A., COUTINHO, A. (1988). The participation of B cell and antibodies in the selection and maintenance of T cell repertoire. *Immunol. Rev.*, 101: 191.

MARSHAL E. & MILLER T.H. (1981). Characterization of the nude rat (nuz). Functional characteristics. *AJEBAK* 59: 287.

MATSUDA A., NISHIMOTO Y., MORITA T. & MATSUYAMA M. (1985). Dexamethasone-induced changes in morphology and keratin organization of rat thymic epithelial cells in primary cultures. *Exp. Cell Res.* 160: 343.

MATSUHASHI N., KAWASE Y. & SUZUKI G. (1989). Effects of cyclosporin A on thymocyte differentiation in fetal thymus organ culture. *Cell. Immunol.* 123: 307.

MATSUHASHI N., KAWASE Y. & SUZUKI G. (1991). Tolerogenic ability of lymphocytes in organ-cultured thymus lobes. *J. Immunol.* 146: 444.

MAZDA, O., WATANABE, Y., GYOTOKU, J.I. & KATSURA, Y. (1991). Requirement of dendritic cells and B cells in clonal deletion of Mls reactive T cells in the thymus. *J.Exp. Med.*, 173: 539.

MILICEVIC N.M., MILICEVIC Z., PILETIC O., MUJOVIC S. & NINKOV V. (1983). Reactivity of thymic metallophilic cells during the regeneration after the application of cyclophosphamide. *J. Reticuloendothelial Soc.* 34: 501.

MILICEVIC N.M. & MILICEVIC Z. (1984). Enzyme histochemical characterization of macrophages in the rat thymus with special reference to metallophic cells of the cortico-medullary zone. J. Leuk. Biol. 36: 761.

MILICEVIC N.M., MILICEVIC Z., COLIC M. & MUJOVIC S. (1987). Ultrastructural study of macrophages in the rat thymus with special reference to the cortico-medullary zone. J. Anat. 150: 89.

MIYAZAWA T., SATO C., HIAI H., NISHI Y. & MATSUYAMA M. (1980). Establishment of a reticular-like cell line from mouse thymuses and its feeder capacity for the growth of bone marrow cells. Cell Struct. Funct. 5: 305.

MOLL R., FRANKE W.W., SCHILLER D.L., GRIGER B. & KREPIER R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 31: 11.

MUÑOZ-BLAY T., NIEBURGS A.C. & COHEN S. (1987). Thymic epithelium in vitro. V. Binding of thymocytes to cultured thymic epithelial cells. Cell. Immunol. 109: 371.

MURAWSKA M.B., DULJVESTIJN A.M., WUBBENA A.S., KLATTER F.A., NIEUWENHUIS P. (1990). Kinetics of thymocyte regeneration in adult adriamycin treated rats: evidence for a exclusive role of bone marrow derived cells. Thymus 15: 131.

MURAWSKA M.B., DULJVESTIJN A.M., KLATTER F.A., AMMERLAAN W., MEEDENDORP B. & NIEUWENHUIS P. (1991). Differential kinetics of various subsets of thymic bone marrow-derived stromal cells in rat chimeras. Scand. J. Immunol. 33: 473.

NABARRA B. & ANDRIANARISON I. (1987). Ultrastructural studies of thymic reticulum. I. The epithelial component. Thymus 9: 95.

NABARRA B. & PAPIERNIK M. (1988). Phenotype of thymic stromal cells. An immunoelectron microscopic study with anti-IA, anti-MAC-1, and anti-MAC-2 antibodies. Lab. Invest. 58: 524.

NABARRA B. & ANDRIANARISON I. (1991). Ultrastructural studies of mouse thymic reticulum. II. Non-epithelial component. Thymus 17: 39.

NAGAMINE J., TAKEDA K., TATSUMI Y., OGATA M., MIYAKE K., HAMAOKA T. & FUJIWARA H. (1991). Role of a thymic stromal cell clone in inducing the stage-specific differentiation of various subpopulations of double negative thymocytes. *J. Immunol.* 147: 1147.

NAGELKERKEN L.M., SCHUTTE B., STET R.J.M. & BREDA-VRIESMAN P.J.C. (1987). Recognition of rat dendritic cells by a monoclonal antibody. *Scand. J. Immunol.* 27: 347.

NAQUET P., LEPESANT H., LUXEMBOURG A., BREKELMANS P., DEVAUX C. & PIERRES M. (1989). Establishment and characterization of mouse thymic epithelial cell lines. *Thymus* 13: 217.

NIEBURGS A.C., PICCIANO P.T., KORN J.H., MC CALISTER T., ALLRED C. & COHEN S. (1985). *In vitro* growth and maintenance of two morphologically distinct populations of thymic epithelial cells. *Cell. Immunol.* 90: 439.

NIKOLIC-ZUGIC J., MOORE M.W. & BEVAN M.J. (1989). Characterization of the subset of immature thymocytes which can undergo rapid *in vitro* differentiation. *Eur. J. Immunol.* 19: 649.

NISHIMURA T., TAKEUCHI Y., GAO X., URANO K. & HABU S. (1991). Monoclonal antibody against actin cross-reacts with the Thy-1 molecule and inhibits lymphocyte function-associated antigen-1-dependent cell-cell interaction of T cells. *J. Immunol.* 147: 2094.

OHKI H., MARTIN C., CORBEL C., COLTEY M. & LE DOUARIN N.M. (1987). Tolerance induced by thymic epithelial grafts in birds. *Science* 237: 1032.

OHKI H., MARTIN C., COLTEY M. & LE DOUARIN N.M. (1988). Implants of quail thymic epithelium generate permanent tolerance in embryonically constructed quail/chick chimeras. *Development* 104: 619.

OLIVER & LE DOUARIN N. (1984). Avian thymic accessory cells. *J. Immunol.* 132: 1748.

OWEN J.J.T. & JENKINSON E.J. (1984). Early events in T lymphocyte genesis in the fetal thymus. *Amer. J. Anat.* 170: 301.

OWEN J.J.T., JENKINSON E.J. & KINGSTON R. (1986). Thymic stem cells: their interaction with the thymic stroma and tolerance induction. En: "Current topics in Microbiology and Immunology". Vol. 126. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.

PALACIOS R. & VON BOHEMER H. (1986). Requirements for growth of immature thymocytes from fetal and adult mice in vitro. Eur. J. Immunol. 13: 147.

PALACIOS R., STUDER S., SAMARIDIS J. & PELKONEN J. (1989). Thymic epithelial cells induced in vitro differentiation of PRO-T lymphocyte clones into TCR $\alpha$ , $\beta$ /T3+ and TCRgamma, $\delta$ /T3+ cells. EMBO J. 8: 4053.

PANTELOURIS E.M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. Nature 217: 370.

PAPIERNIK M. & NABARRA B. (1981). Thymic reticulum in mice. I. Cellular ultrastructure in vitro and functional role. Thymus 3: 345.

PAPIERNIK M., NABARRA B., SAVINO W., PONTOUX C. & BARBEY S. (1983). Thymic reticulum in mice. II. Culture and characterization of nonepithelial phagocytic cells of the thymic reticulum: their role in the syngeneic stimulation of thymic medullary lymphocytes. Eur. J. Immunol. 13: 147.

PAPIERNIK M., DOMBRET H., STEFANOS S. & WIETZERBIN J. (1986). Control of Ia antigen expression on phagocytic cells of the thymic reticulum by interferon-gamma and prostaglandins. Eur. J. Immunol. 16: 296.

PAPIERNIK M., PENIT C. & EL ROUBY S. (1987). Control of prothymocyte proliferation by thymic accessory cells. Eur. J. Immunol. 17: 1303.

PATERSON D.J. & WILLIAMS A.F. (1987). An intermediate cell in thymocyte differentiation that expresses CD8 but not CD4 antigen. J. Exp. Med. 166: 1603.

PATTERSON S., GROSS J., BEDFORD P. & KNIGHT C. (1991). Morphology and phenotype of dendritic cells from peripheral blood and their productive and non-productive infection with human immunodeficiency virus type 1. Immunology 72: 361.

PEARSE, A.G.E. (1972). Histochemistry: theoretical and applied, 3rd. ed. J. & A. Churchill. Edinburg, London and New York.

PELLETIER M., TAUTU C., LANDRY D., MONTPLAISIR S., CHARTRAND C. & PERREAULT C. (1986). Characterization of human thymic dendritic cells in culture. *Immunology* 58: 263.

PENIT C. & VASSEUR F. (1988). Sequential events in thymocyte differentiation and thymus regeneration revealed by a combination of bromodeoxyuridine DNA labeling and antimitotic drug treatment. *J. Immunol.* 140: 3315.

PETERS y col., (1987). *Immunobiology* 176: 154.

PLUM J., DE SMEDT M., TISON B. & LECLERCQ G. (1989). Influence of antibodies neutralizing cytokines on murine fetal thymic organ cultures. *Thymus* 13: 83.

PLUM J., DE SMEDT M., LECLERCQ G. & TISON B. (1990). Inhibitory effect of murine recombinant IL-4 on thymocyte development in fetal thymus organ cultures. *J. Immunol.* 145: 1066.

PLUM J., DE SMEDT M., BILLIAU A., HEREMANS H., LECLERCQ G. & TISON B. (1991). IFN-gamma reverses IL-4 inhibition of fetal thymus growth in organ cultures. *J. Immunol.* 147: 50.

POLLARD A.M. & LIPSCOMB M.F. (1990). Characterization of murine lung dendritic cells: similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. *J. Exp. Med.* 172: 159.

PUGH C.W., MACPHERSON G.G. & STEER H.W. (1983). Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J. Exp. Med.* 157: 1758.

RAEDLER A., RAEDLER E., SCHOLZ K.-U., ARNDT R. & THIELE H.-G. (1983). *Thymus* 5: 311.

RAMSDRELL F. & FOWLKES B.J. (1990). Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* 248: 1342.

READY R.A., JENKINSON E.J., KINGSTON R. & OWEN J.J.T. (1984). Successful transplantation across major histocompatibility barrier of deoxyguanosine-treated embryonic thymus expressing class II antigens. *Nature* 319: 231.

ROBINSON J.H. & OWEN J.J.T. (1976). Generation of T-cell function in organ culture of foetal mouse thymus. I. Mitogen responsiveness. Clin. Exp. Immunol. 23: 247.

ROBINSON A.P., WHITE T.M. & MASON D.W. (1986). Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the later recognizing complement receptor type 3. Immunology 57: 239.

ROCHA B., LEHUEU A. & PAPIERNIK M. (1988). IL-2 dependent proliferation of thymic accessory cells. J. Immunol. 140: 1076.

ROCHA B., VASSALI P. & GUY-GRAND D. (1991). The V $\beta$  repertoire of mouse gut homodimeric  $\alpha$  CD8+ intraepithelial T cell receptor  $\alpha\beta$  lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. J. Exp. Med. 173: 483.

ROLSTAD B. & FOSSUM S. (1990). Non-adaptative cellular immune responses as studied in euthymic and athymic nude rats. Anat. Embryol. 181: 215.

ROMANI N., KOIDE S., CROWLEY M., WITMER-PACK M., LIVINGSTONE A.M., FATEMAN C.G., INABA K. & STEINMAN R.M. (1989). Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature epidermal Langerhans cells. J. Exp.Med. 169: 1169.

ROSENBERG A.S. & SINGER A. (1992). Cellular basis of allograft rejection: An in vivo model of immune-mediated tissue destruction. Ann. Rev.Immunol. 10: 333.

RUMPOLD H., FORSTER O., BOCK G., SWETELY P. & RIEDL M. (1982). Antigenic heterogeneity of rat macrophages. A monoclonal antibody reacting only with alveolar but not with other types of macrophages. Immunology 45: 637.

SAKAGUCHI S. & SAKAGUCHI N. (1988). Thymus and immunity. Transplantation of the thymus from cyclosporin A-treated mice causes organ-specific autoimmune disease in athymic nude mice. J. Exp. Med. 167: 1479.

SAVINO W., ITOH T., IMHOF B.A. & DARDENNE M. (1986). Immunohistochemical studies on the phenotype of murine and human thymic stromal cell lines. Thymus 8: 245.

SCHRADER J.W. (1986). The panspecific hemopoietin of activated T lymphocytes (Interleukin-3). *Ann. Rev. Immunol.* 4: 205.

SCHREIBER L., ESHEL I., MEILIN Y. & SHOHAM J. (1991). Analysis of thymic stromal cell subpopulations grown in vitro on extracellular matrix in defined medium. III. Growth conditions of human thymic epithelial cells and immunomodulatory activities in their culture supernatant. *Immunology* 74: 621.

SCHULER G. & STEINMAN R.M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161: 526.

SCHULTE-WISSERMAN H., MANNING D. & HONG R. (1978). Transplantation of cultured thymus fragments. I. Morphologic and technical considerations. *Scand. J. Immunol.* 8: 387.

SCHUURMAN H.-J., VOS J.G., VAN DE BRINK E. & KATER L. (1982). Culture of thymic epithelium for transplantation purposes: morphological characterization and in vivo biological effect on thymus-dependent immunity in athymic (nude) rats. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 24: 218.

SCHUURMAN H.-J., VOS J.G., BROEKHUIZEN R., BRANDT C.J.W.M. & KATER L. (1985). In vivo biological effect of allogeneic cultured thymic epithelium on thymus-dependent immunity in athymic nude rats. *Scand. J. Immunol.* 21: 21.

SCHUURMAN H.-J., VAESSEN L.M.B., VOS J.G., HERTOOGH A., GEKRTZEMA J.G.N., BRANDT C.J.W.M. & ROZING J. (1986). Implantation of cultured thymic fragments in congenitally athymic nude rats: ignorance of thymic epithelial haplotype in generation of alloreactivity. *J. Immunol.* 137: 2440.

SCHUURMAN H.-J., VAESSEN L.M.B., BROEKHUIZEN R., BRANDT C.J.W.M., HOLEWIJN M.C., VOS J.G. & ROZING J. (1987). Implantation of cultured thymic fragments in congenitally athymic (nude) rats. Influx of lymphocytes and dendritic cells. *Scand. J. Immunol.* 26: 129.

SCHUURMAN H.-J., ROZING J., BROEKHUIZEN R., TIELEN F. & VAN DE BERGH P. (1989). Implantation of cultured thymus fragments in athymic nude rats: studies on tolerance towards donor haplotype. *Thymus* 13: 123.



SCHUURMAN H.-J., VAN LOVEREN H., ROZING J, VAN DIJK A., LOEBER J.G. & VOS J.G. (1990). Cyclosporin and the rat thymus. An immunohistochemical study. *Thymus* 16: 235.

SETO S., CARRERA C.J., KUBOTA M., WASSON D.B. & CARSON D.A. (1985). Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 75: 337.

SETUM C.A., SERIE J.R. & HEGRE O.D. (1991). Comparative analysis of potency of splenic dendritic and adherent cells (macrophages) as alloantigen presenters in vivo. *Diabetes* 40: 1719.

SFAKSI A., BONNEVILLE M. & SOULILLOU J.P. (1985). Cellular immune response in rnu/rnu rats. I. Lectin responsiveness and IL-2 production kinetics of natural toxicity and spleen-cell surface marker expression. *Immunology* 55: 655.

SHIMONKEVITZ R.P., HUSMANN L.A., BEVAN M.J. & CRISPE I.N. (1987). Transient expression of IL-2 receptor precedes the differentiation of immature thymocytes. *Nature* 329: 157.

SHORES E.W., VAN EWIJK W. & SINGER A. (1991). Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor negative SCID mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *Eur. J. Immunol.* 21: 1657.

SHORTMAN K., VREMEC D., D'AMICO A., BATTYE, F. & BOYD R. (1989). Nature of thymocytes associated with dendritic cells and macrophages in thymic rosettes. *Cell. Immunol.* 119: 85.

SHORTMAN K. (1992). Cellular aspects of early T-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 4: 140

SIEGEL R.M., YUI K., TEHLENHOLZ D.E., KUBO R. & GREENE M.I. (1990). Inhibition of T cell development in thymic organ culture: implications for the mechanism of action of cyclosporin A. *Eur. J. Immunol.* 20: 753.

SINGER K.H., WOLF L.S., LOBACH D.F., DENNING S.M., TUCK D.T., ROBERTSON A.L. & HAYNES B.F. (1986). Human thymocytes bind to autologous and allogeneic thymic epithelial cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* 83: 6588.

SINGER K.H. (1990). Interactions between epithelial cells and T lymphocytes: role of adhesion molecules. *J. Leuk. Biol.* 48: 367.

SKINNER M., LE GROS G., MARBROOK J. & WATSON J.D. (1987). Development of fetal thymocytes in organ cultures. Effect of interleukin 2. *J. Exp. Med.* 165: 1481.

SMINIA T., VAN ASSELT A.A., VAN DE ENDE M.B. & DIJKSTRA C.D. (1986). Rat thymus macrophages: an immunohistochemical study on fetal, neonatal and adult thymus. *Thymus* 8: 141.

SOEJIMA T., NAGAYAMA A., SADO T. & TANIGUCHI M. (1988). Acquisition of repertoires of suppressor T cells under the influence of macrophages. *J. Mol. Cell Immunol.* 4: 87.

SOMOZA C., FERNANDEZ-RUIZ E., REBOLLO A., SANZ E., RAMIREZ F. & SILVA A. (1990). OX-48, a monoclonal antibody against a 70,000 MW rat activation antigen expressed by T cells bearing the high-affinity interleukin-2-receptor. *Immunology* 70: 210.

SPEISER D.E., STUBI U. & ZINKERNAGEL R.M. (1992). Extrathymic positive selection of  $\alpha\beta$  T-cell precursors in nude mice. *Nature* 355: 170.

SPRENT J., LO D., GAO E.K., RON Y. (1988). T cell selection in the thymus. *Immunol. Rev.* 101: 173.

STEINER G., TSCHACHLE E., TANI M., MALEK T.R., SHEVACH E.M., HOLTER W., KNAPP W., WOLFF K. & STINGL G. (1986). Interleukin-2 receptors on cultured murine epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* 137: 155.

STEINMAN R.M. & COHN Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137: 1142.

STEINMAN R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271.

STRIETER R.M., REMICK D.G. & LYNCH J.P.III, SPENGLER R.N. & KUNKEL S.L. (1989). Interleukin-2 induced tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) gene expression in alveolar macrophage and blood monocytes. *Ann. Rev. Respir. Dis.* 139: 335.

SUN T.-T., BONITZ P. & BURNS W.H. (1984). Cell culture of mammalian thymic epithelial cells: Growth, structural, and antigenic properties. *Cell. Immunol.* 83: 1.

SUZUKI G., MORIYAMA T., TAKEUCHI Y., KAWASE Y. & HABU S. (1989). Split tolerance in nude mice transplanted with 2'-deoxyguanosine-treated allogeneic thymus lobes. *J. Immunol.* 142: 1463.

TAKEUCHI Y., HORIUCHI Y., SUGIMOTO T., MATSUDA H., YAGITA H. & OKUMURA K. (1990). Effects of cyclosporin A on T-cell development in organ-cultured foetal thymus. *Immunology* 71: 158.

TAKEYA M., HSIAO L., SHIMOKAWA Y. & TAKAHASHI K. (1989). Heterogeneity of rat macrophages recognized by monoclonal antibodies: An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 635.

TUCEK C.L. & BOYD R.L. (1990). Surface expression of CD4 and Thy-1 on mouse thymic stromal cells. *Inter. Immunol.* 2: 593.

VAESSEN L.M.B., BROEKHUIZEN R., ROZING J., VOS J.G. & SCHUURMAN H.-J. (1986). T-cell development during ageing in congenitally athymic (nude) rats. *Scand. J. Immunol.* 24: 223.

VAN DONGEN J.J.M., COMANS-BITTER W.M., WOLVERS-TETTERO I.L.M. & BORST J. (1990). Development of human T lymphocytes and their thymus dependency. *Thymus* 16: 207.

VAN EWIJK W. (1984). Immunohistology of lymphoid and non-lymphoid cells in the thymus in relation to lymphocyte differentiation. *Am. J. Anat.* 170: 311.

VAN EWIJK W. (1991). T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 591.

VAN GULIK T.M., HULLETT D.A., BOUDJEMA K., LANDRY A.S., SOUTHARD J.H., SOLLINGER H.W. & BELZER F.O. (1990). Prolonged survival of murine thyroid allografts after 7 days of hyperbaric organ culture in the UW preservation solution at hypothermia. *Transplantation* 50: 971.

VAN LOVEREN H., SCHURMAN H.-J. & VOS J.G. (1988). Immune deficiency syndrome in rodents: the nude rat. En "New developments in biosciences: their implication for laboratory animal science". Beynen, A.C. & Solleved, H.A. Eds., Martinus Nijhoff, Dordrecht, pg. 17.

VAN LOVEREN H., SCHURMAN H.-J., KAMPINGA J. & VOS J.G. (1991). Reversibility of thymic atrophy induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenceno-p-dioxin (TCDD) and bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO). Int. J. Immunopharmacol. 13: 369.

VAN VLIET E., MELIS M. & VAN EWIJK W. (1986). The influence of dexamethasone treatment on the lymphoid and stromal composition of the mouse thymus: a flow cytometric and immunohistological analysis. Cell Immunol. 103: 229.

VICENTE A. & ZAPATA A. (1991). Ontogenetic development of the thymic stroma of Wistar rats. En: "Lymphatic Tissues and In vivo Immune Responses". Marcell Dekker Inc., New York. pg. 49.

VIRELIZIER J.-H., PEREZ N., ARENZANA-SEISDEDOS F. & DEVOS R. (1984). Pure interferon gamma enhances Class II HLA antigens on human monocyte cell lines. Eur. J. Immunol. 14: 106.

VOS J.G., BERKVEN J.M & KRUIJT B.C. (1980a). The athymic nude rat. I. Morphology of lymphoid and endocrine organs. Clin. Immunol. Immunopathol. 15: 213.

VOS J.G., BUYS J., BEEKHOF P. & HAGENAARS A.M. (1980b). Quantification of total IgM and IgG and specific IgM and IgG to a thymus-independent (Ips) and a thymus-dependent (tetanus toxoid) antigen in the rat by the enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). Ann. N.Y. Acad. Sci. 320: 518.

VOS J.G., DE KLERK A., KRAJNC E.I., KRUIZINGA W., VAN OMMEN B. & ROZING J. (1984). Toxicity of Bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat. Tox. Appl. Pharmacol. 75: 387.

WAANDERS G.A., GODFREY D.I. & BOYD R.L. (1989). Modulation of T-cell differentiation in murine fetal thymus organ cultures. Thymus 13: 73.

WACKER H.-H., RAZUN H.J. & PARKWESCH M.R. (1985). KI-M2R, a new specific monoclonal antibody discriminates tissue macrophages from reticulum cells and monocytes in vivo and in vitro. J. Leuk. Biol. 38: 509.

WATANABE Y., GYOTOKU J.-I. & KATSURA Y. (1989). Analysis of the development of T cells by transferring precursors into cultured fetal thymus with a microinjector. Thymus 13: 57.

WATANABE Y., SUDO T., MINATO N., OHNISHI A. & KATSURA Y. (1991). Interleukin 7 preferentially supports the growth of gamma- $\delta$  T cell receptor-bearing T cells from fetal thymocytes in vitro. Inter. Immunol. 3: 1067.

WATANABE Y. & JACOB C.O. (1991). Regulation of MHC Class II antigen expression. Opposing effects of tumor necrosis factor alpha on IFN-gamma induced HLA-DR and Ia expression depends on the maturation and differentiation stage of the cell. J. Immunol. 146: 899.

WATKINS E.B. & SHARP J.G. (1979). Growth and survival of irradiated, cultured mouse thymic non-lymphoid cells. J. Ret. Soc. 26: 209.

WATSON J.D., MORRISEY P.J., NAMEN A.E., COULON P.J. & WIEDMER M.B. (1989). Effect of IL-7 on the growth of fetal thymocytes in culture. J. Immunol. 143: 1215.

WEBB S.R. & SPRENT J. (1990). Tolerogenicity of thymic epithelium. Eur. J. Immunol. 20: 2525.

WEISS L. (1991). Barrier cells in spleen. Immunol. Today 12: 24

WOOD P.M.D., JORDAN R.K., GIVAN A.L. & BROOKS C.G. (1990). IL-3 and IL-4 affect thymocyte differentiation in organ culture. Immunology 71: 83.

WU L., SCOLLAY R., EGERTON M., PEARSE M., SPANGRUDE G.J. & SHORTMAN K. (1991). CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. Nature 349: 71.

YOUNG J.W. & STEINMAN R.M. (1988). Accessory cell requirements for the mixed-leukocyte reaction and polyclonal mitogens, as studied with a new technique enriching blood dendritic cells. Cell. Immunol. 111: 167.

YUUKI H., YOSHIKAI Y., KISHIHARA K., IWASAKI A., MATSUZAKI G., OGIMOTO M. & NUMOTO K.  
(1990). Deletion of self-reactive T cells in nude mice grafted with neonatal allogeneic thymus.  
J. Immunol. 144: 474.

ZEIRA M. & GALLILY R. (1988). Interaction between thymocytes and thymus-derived  
macrophages. Cell Immunol. 117: 277.

## **TABLAS Y FIGURAS**

**TABLA 1.**

**Anticuerpos utilizados.**

<b>ANTICUERPO</b>	<b>ESPECIFICIDAD</b>
OX-8 <sup>m,1</sup>	células T citotóxicas (CD8)
W3/25 <sup>m,1</sup>	células T colaboradoras/macrófagos (CD4)
ER-2 <sup>m,2</sup>	células T colaboradoras/macrófagos (CD4)
OX-39 <sup>m,1</sup>	IL-2R cadena $\alpha$ (CD25)
OX-7 <sup>m,1</sup>	Thy-1.1
OX-19 <sup>m,1</sup>	CD5
R73 <sup>m,3</sup>	TcR $\alpha\beta$ , dominio constante
OX-42 <sup>m,1</sup>	CD11b,c
OX-44 <sup>m,1</sup>	células mieloides de rata
OX-48 <sup>m,4</sup>	antígeno de activación de células T de rata
OX-18 <sup>m,1</sup>	MHC clase I, monomórfico
U9-F4-B1 <sup>m,5</sup>	MHC clase I, polimórfico (RTF)
OX-6 <sup>m,1</sup>	MHC clase II, monomórfico
OX-17 <sup>m,1</sup>	MHC clase II, monomórfico
ER-13 <sup>m,2</sup>	MHC clase II, monomórfico
His-19 <sup>m,6</sup>	MHC clase II, polimórfico (presente en todas las cepas de rata excepto las que expresan RTF)
F17-23-2 <sup>m,7</sup>	MHC clase II, polimórfico (RTI <sup>a,1,n</sup> )
OX-3 <sup>m,1</sup>	MHC II, polimórfico (RTI <sup>v,1</sup> )
ED1 <sup>m,8</sup>	macrófagos corticales y medulares tímicos de rata
ED2 <sup>m,8</sup>	macrófagos corticales tímicos de rata
MA-071 <sup>p,9</sup>	citoqueratina
A575 <sup>p,10</sup>	citoqueratina
His-38 <sup>m,6</sup>	células epiteliales tímicas corticales
His-39 <sup>m,6</sup>	células epiteliales tímicas subcapsulares y medulares
MA-074 <sup>m,9</sup>	vimentina
B44 <sup>m,11</sup>	BrdU

m: anticuerpo monoclonal producido en ratón  
 p: anticuerpo policlonal producido en conejo  
 1: Serotec, Oxford, Inglaterra  
 2: Dr. J. Rozing, Rotterdam, Holanda  
 3: Dr. T. Hünig, Würzburg, Alemania  
 4: Cedido por el Dr. A. Silva, CSIC, Madrid  
 5: Dr. A. Santema, Leiden, Holanda  
 6: Dr. J. Kampinga, Groningen, Holanda  
 7: Dr. J.W. Fabre, Londres, Inglaterra  
 8: Dr. C. Dijkstra, Amsterdam, Holanda  
 9: Biogenex Laboratoires, Dublin, CA  
 10: Dako, Glostrup, Dinamarca  
 11: Becton-Dickinson, Mountain View, CA



TABLA 2.

Diseño del protocolo seguido para el estudio del comportamiento in vivo de los fragmentos tímicos trasplantados. Los fragmentos se cultivaron adheridos al soporte de cultivo en RPMI-1640 y 10% de FCS (control) o en presencia de dGuo 1,35mM ó 4,0mM.

Los números indican el momento (en días) en que se extrajeron los riñones para su análisis y entre paréntesis se indica el número de riñones analizados en cada caso.

DONANTE							
		RATON		RATA			
		Fragmentos tímicos sin cultivar	Fragmentos tímicos cultivados control	Fragmentos tímicos sin cultivar	Fragmentos tímicos cultivados control	Fragmentos tímicos cultivados 1,35mM dGuo	Fragmentos tímicos cultivados 4,0mM dGuo
H U E S P E D	WISTAR	4 (2) 5 (1) 7 (1) 14 (2)	4 (2) 7 (1) 14 (2)	4 (2) 5 (1) 14 (2)	2 (4) 4 (2) 5 (4) 14 (2) 21 (2) 26 (2) 28 (3) 33 (2) 28 (3) 33 (2) 42 (2)	2 (4) 5 (4) 21 (2) 26 (2) 28 (3) 33 (2) 42 (2)	
	AO		7 (1) 28 (1)		7 (5) 28 (5)	7 (2) 28 (2)	7 (2) 28 (2)

TABLA 3.

Diseño de los trasplantes de los fragmentos cultivados en suspensión (ver explicación en el apartado VI de MATERIALES Y METODOS).

FRAGMENTOS		COMBINACION	TIEMPO DE SACRIFICIO (Semanas)
H		Singénica	2, 4, 6
U			
E N		Alogénica	2, 4, 6
S U			
P D		Singénica	1, 2, 3, 4
E E			
D		Alogénica	1, 2, 3
H E		Singénica	1, 2, 3, 4
U U			
E T		Alogénica	1, 2, 3
S I			
P M		Singénica	1, 2, 3, 4
E I			
D C		Alogénica	1, 2, 3
O			

TABLA 4.

Fenotipo de las células presentes en los cultivos primarios. Los resultados se dan en porcentaje de células positivas. El método de conteo está detallado en el apartado IIIIf de MATERIALES y METODOS.

	Fibrobl.	Epitel.	PTR	Macróf.	DC
Vimentina	100	0	100	100	0
Citoqueratina	0	100	0	0	0
MHC clase I	100	100	100	100	100
MHC clase II	0	(*)	30-50	0	100
OX-42	0	0	50-70	0	0
OX-39	0	0	30-50	0	0
ED1	0	0	50(*)	50(*)	0
ED2	0	0	50(*)	50(*)	0
APH/NSE	0	0	(*)	(*)	(*)

(\*): ver texto

=====

TABLA 5.

Fenotipo de los macrófagos tímicos de rata tras el aislamiento (día 1) y después de 30 días de cultivo (día 30). Los resultados se dan en porcentaje de células positivas.

El método de conteo, que está detallado en el apartado IVc de MATERIALES Y METODOS, es el mismo para ésta y las tablas en las que se muestran porcentajes de macrófagos o células dendríticas positivos.

	Día 1	Día 30
MHC clase I	100	100
MHC clase II	50-60	10-20
Thy-1	50-60	10-20
OX-42	60-70	100
OX-39	0	0
OX-48	0	100
W3/25	80-90	80-90
OX-44	70-80	100
ED1	90-100	90-100
ED2	40-50	60-70
APH/NSE	100	100

**TABLA 6.**

Cambios inducidos por la rIL-2 y Con A-SCM en los macrófagos cultivados de día 30. Los resultados se dan en porcentaje de células positivas.

	Día 30	Día 30+rIL-2	Día 30+Con A-SCM
MHC clase II	10-20	80-100	90-100
Thy-1	10-20	10-20	80-90
OX-39	0	80-100	30-50

=====

**TABLA 7.**

Fenotipo de las células dendríticas de timo de rata tras el aislamiento (día 1). Los resultados se dan en porcentaje de células positivas.

MHC clase I	100
MHC clase II	100
Thy-1	100
OX-42	40-50
OX-39	0
OX-48	100
OX-44	70-100
W3/25	0
ED1/ED2	0
APH/NSE	50*

(\*) ver texto

FIGURA I.

Protocolo seguido para el aislamiento y cultivo de macrófagos y células dendríticas de timo (ver apartado IV de MATERIALES Y METODOS).

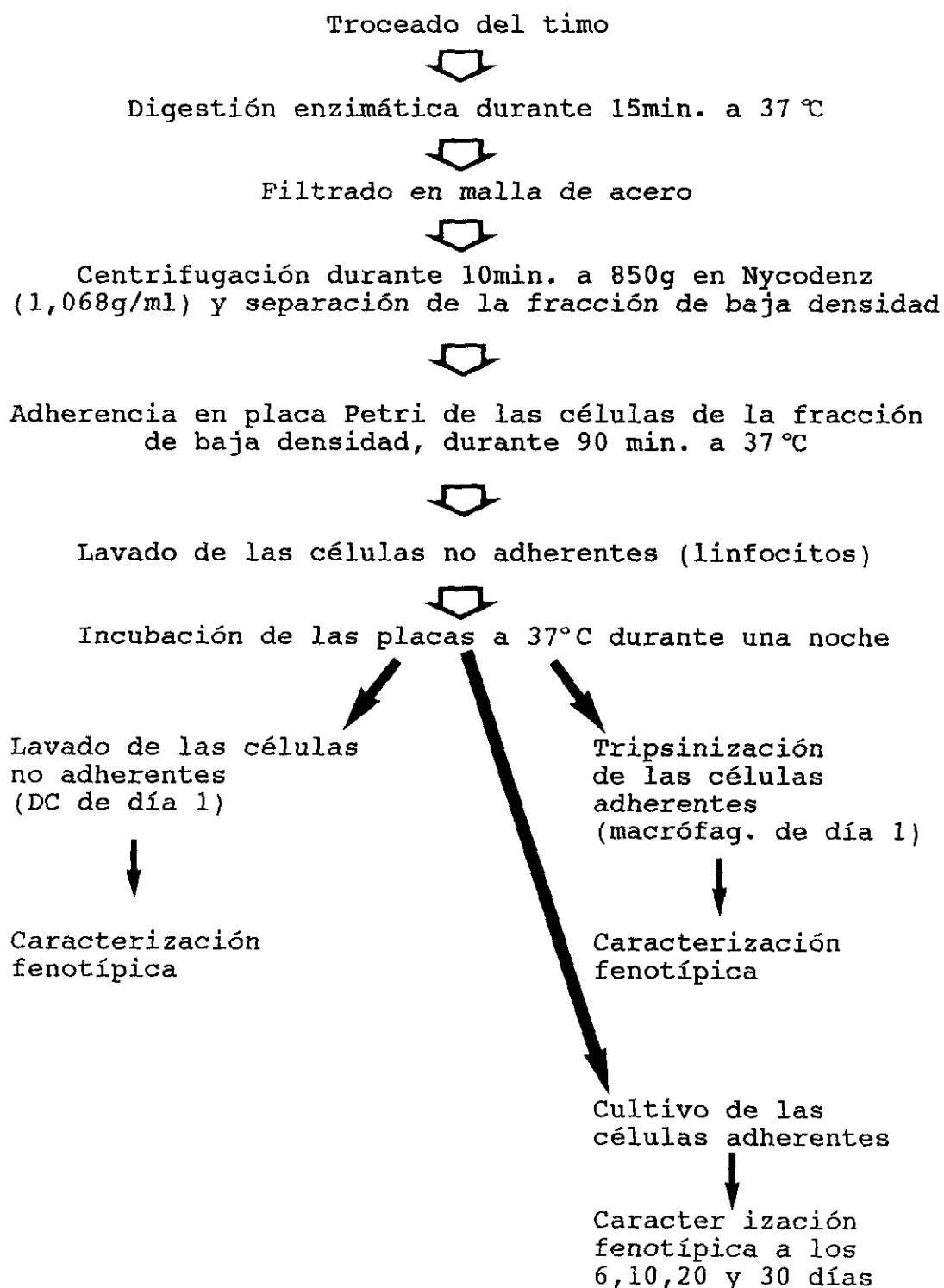


FIGURA II.

Colonia epitelial.

F, fragmento; Fb, fibroblastos.

- 1, células poligonales en el interior de la colonia
- 2, células degeneradas
- 3, zonas proliferativas en el borde de la colonia
- 4, células poligonales en el límite de la colonia
- 5, zonas proliferativas en el interior de la colonia.

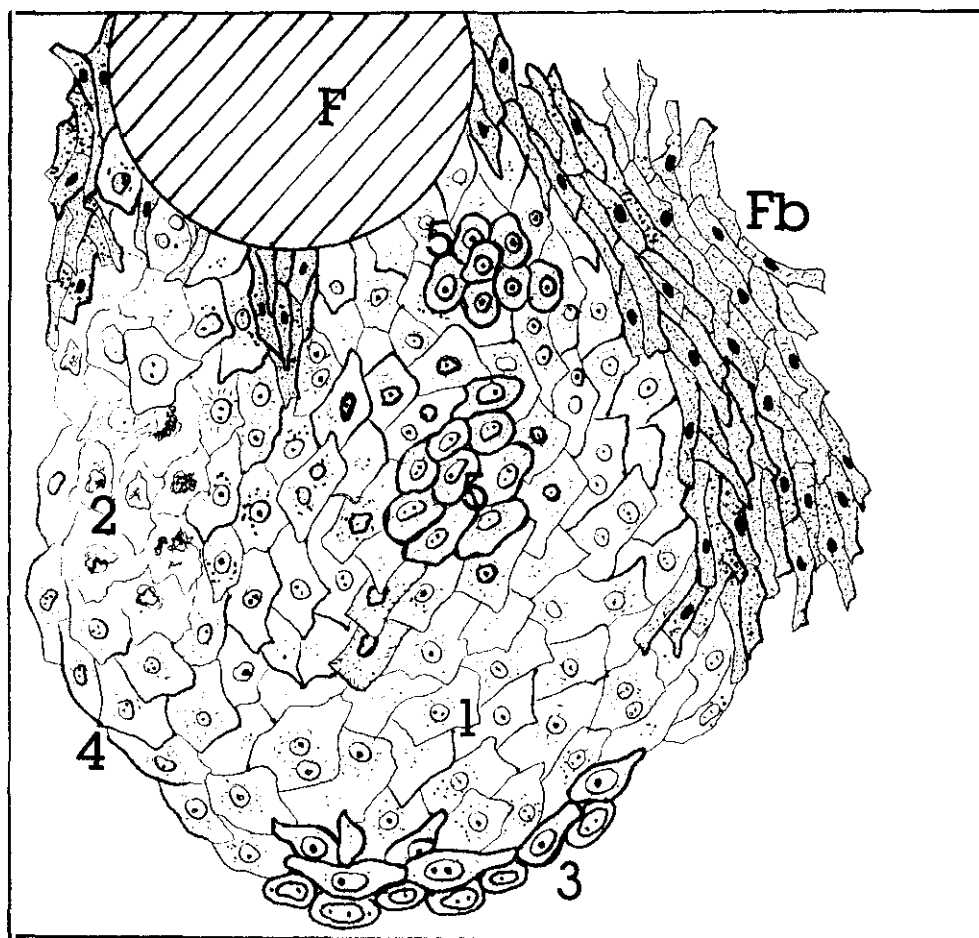


FIGURA III.

Principales fases del cultivo.

(a) 0-4 días de cultivo. (F) Fragmento.

(b) 5-8 días de cultivo. (\*) asociaciones PTR-timocito y DC-timocito.

(c) 9-15 días de cultivo. A, borde proliferativo epitelial; B, colonia de PTR; C, zona de reinicio de la proliferación linfoide.

TIPOS CELULARES: 1, fibroblasto; 2, célula epitelial; 3, linfocito; 4, blasto; 5, PTR; 6, macrófago tipo 1; 7, macrófago tipo 2; 8, célula dendrítica

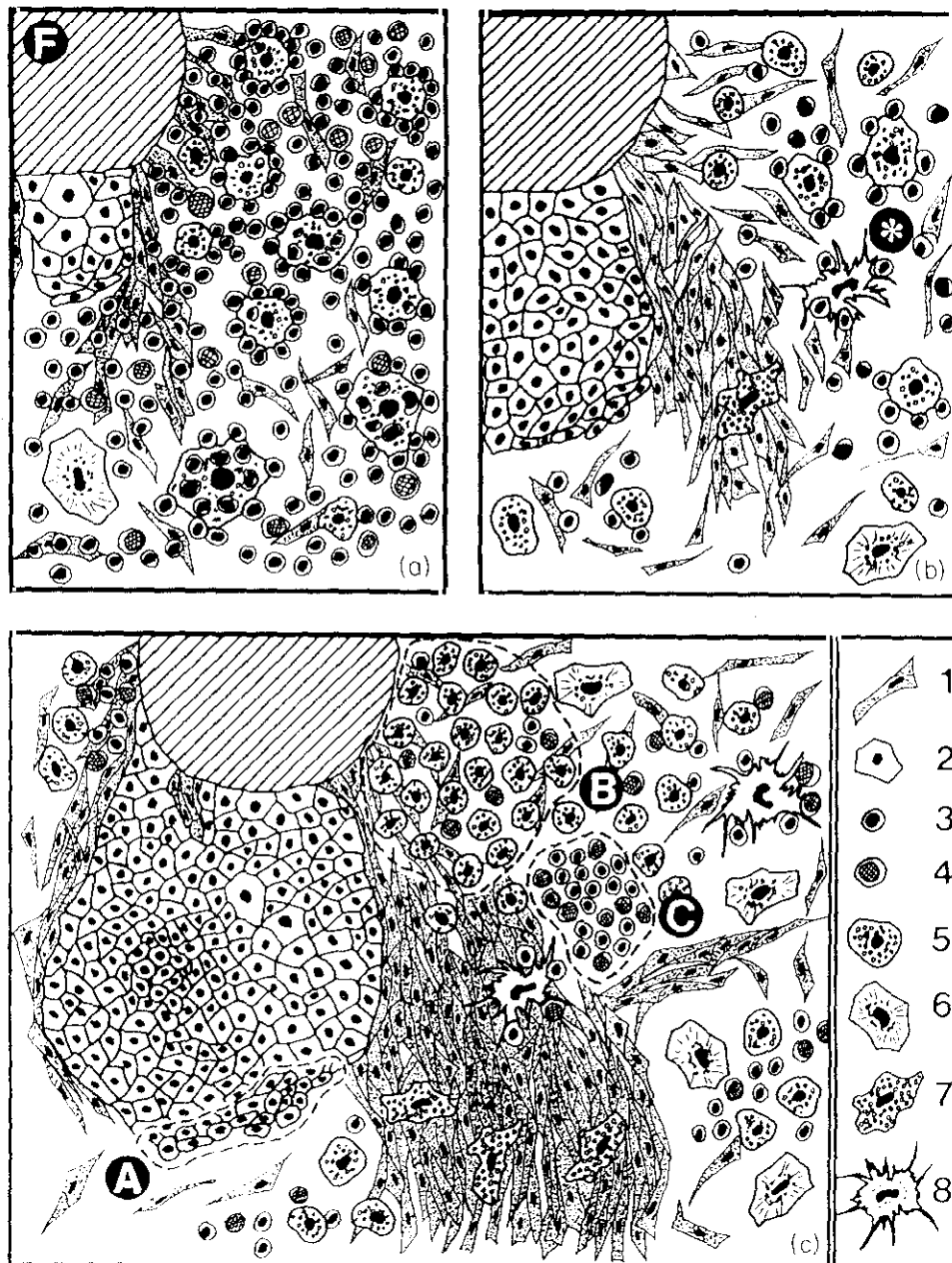
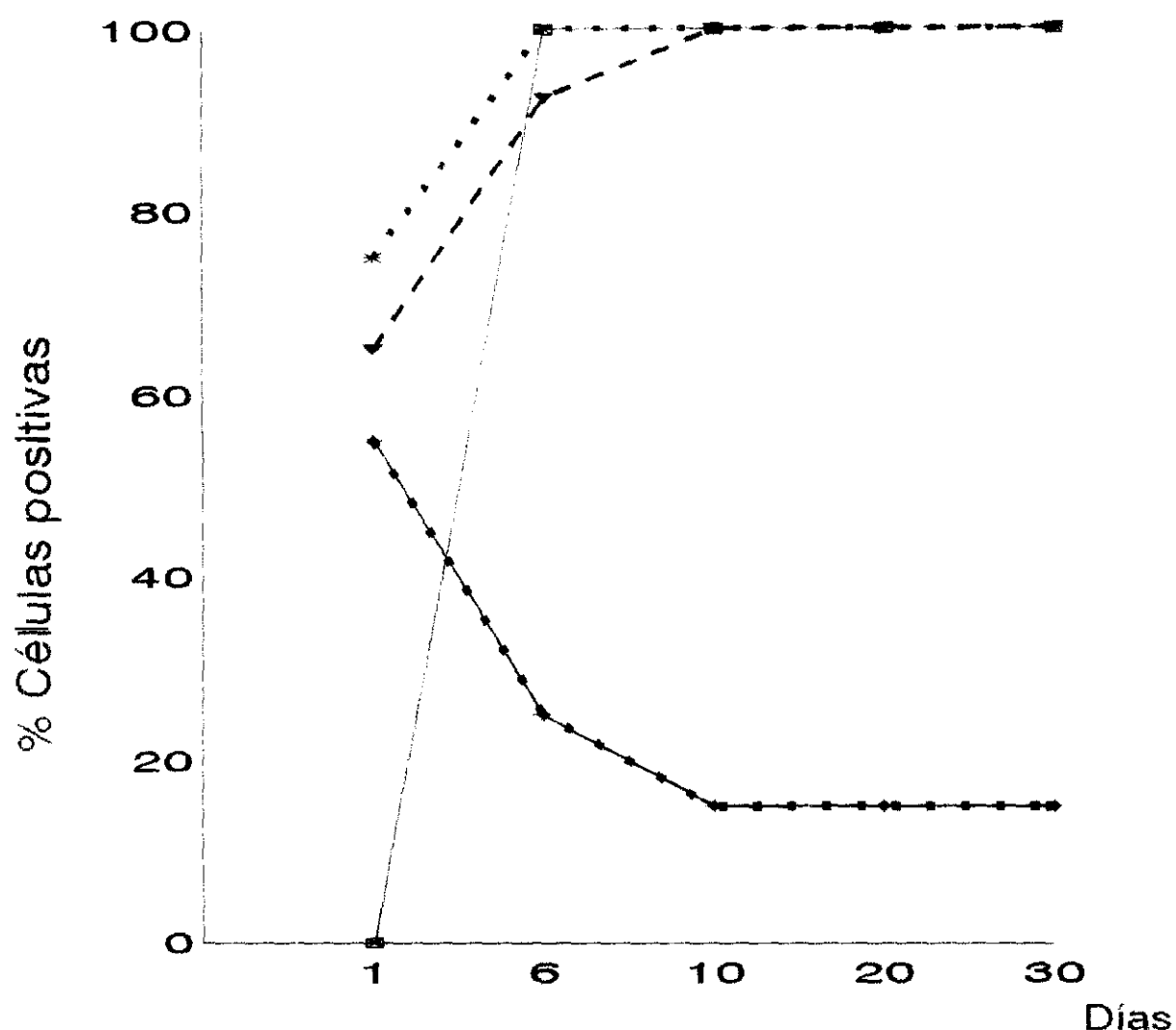


FIGURA IV. Cambios en el porcentaje de macrófagos que expresan moléculas del MHC de clase II y Thy 1 y los antígenos detectados por los Ac OX-42, OX-48 y OX-44.



◆ MHC clase II	50-60	20-30	10-20	10-20	10-20
+ Thy-1	50-60	20-30	10-20	10-20	10-20
▼ OX-42	60-70	90-95	100	100	100
⊕ OX-48	0	100	100	100	100
* OX-44	70-80	100	100	100	100



FIGURA V.

Posibles relaciones entre PTR, macrófagos y DC del cultivo primario (A), macrófagos e IDC identificadas in situ (B) y macrófagos y DC aisladas de timo (C). 1, monocito; 2 pro-DC; 3, DC; 4, pro-PTR; 5, PTR; 6, macrófago tipo 1; 7, macrófago tipo 2; 8, macrófago intratímico; 9, IDC intratímica; 10, macrófago aislado del timo de la fracción de baja densidad; 11, DC aislada del timo de la fracción de baja densidad.

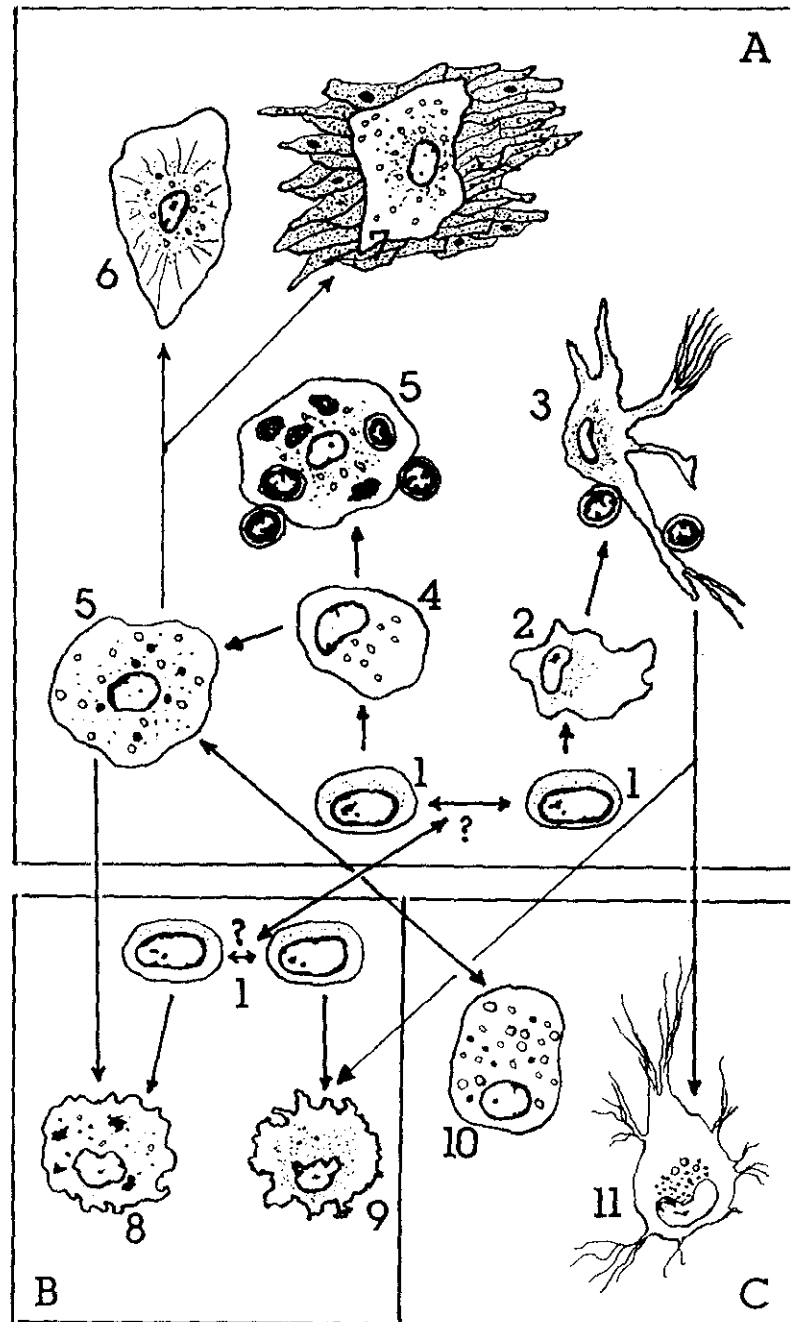


Figura 1. Primeras fases de un cultivo primario de estroma tímico de rata (0-4 días de cultivo). Linfocitos (▲), fibroblastos (↑) y PTR (↑) proliferan a partir de los fragmentos (F) cultivados. x100.

Figura 2. Núcleo secundario (■) donde se aprecia la activa proliferación de PTR (↑) ligada a zonas de fibroblastos (▲). x200.

Figura 3. Primeras etapas en la formación de una colonia epitelial (Ep) en un cultivo primario de 5-8 días. Se observa que la mayoría de células linfoides ha desaparecido del cultivo. F, fragmento. x100

Figura 4. Zona de un cultivo de 5-8 días con abundantes macrófagos de tipo 1 (▲) y fibroblastos (↑). F, fragmento. x100.

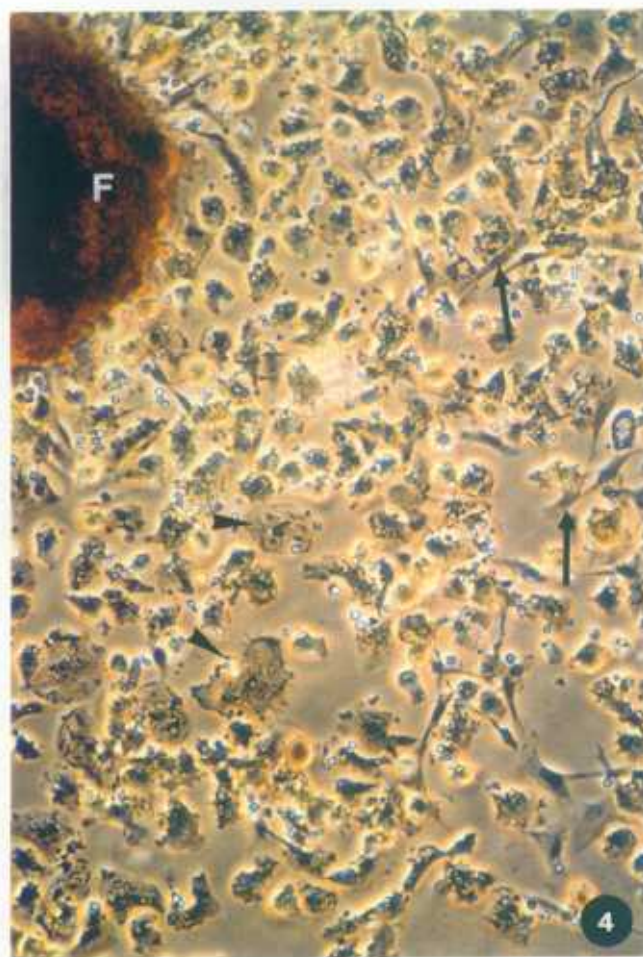
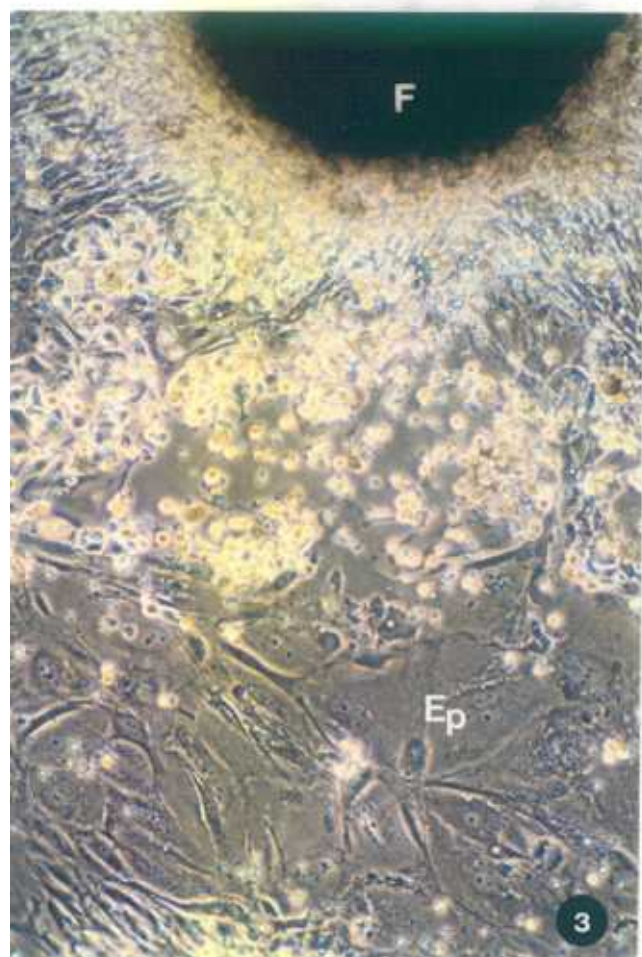
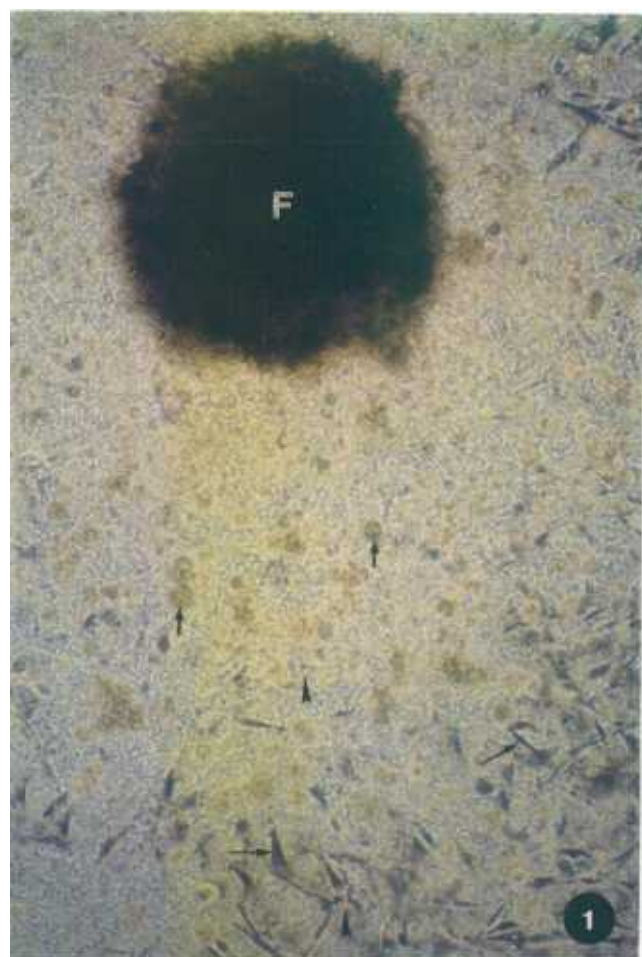


Figura 5. Células dendríticas (DC) en un cultivo primario de 7 días caracterizadas por sus numerosas ramificaciones y alta expresión de moléculas del MHC de clase II (células OX-6+). Se observa la íntima asociación establecida con los linfocitos próximos (◄), algunos de los cuales son también positivos para OX-6 (←), pero no así los fibroblastos (◄). x400.

Figura 6. Proliferación linfoide (←) en la cercanía de un fragmento (F) después de 15 días de cultivo. Nótese cómo en el área de proliferación linfoide abundan también las PTR (◄). x200.

Figura 7. Morfología de los diferentes tipos de fibroblastos presentes a los 7 días de cultivo: (←) alargados, (◄) estrellados y (◄) poligonales. Se puede apreciar la disposición de los haces de vimentina del citoesqueleto en cada de una de ellos. (◄), PTR. (★), macrófagos de tipo 1. x400.

Figura 8. Expresión de moléculas del MHC de clase I (OX-18+): débil y homogénea en fibroblastos (←) y fuerte en PTR (◄). x100.



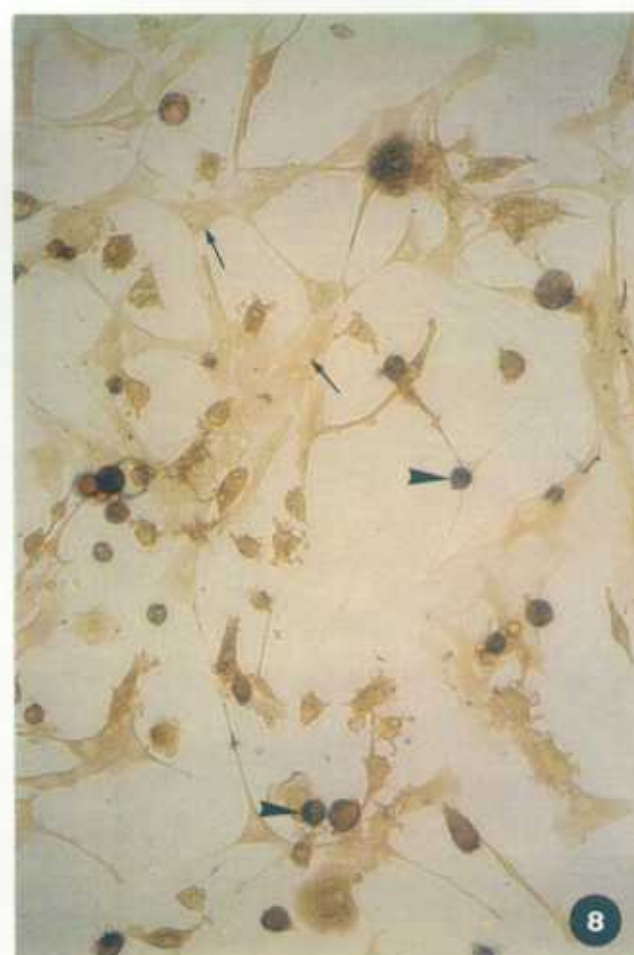
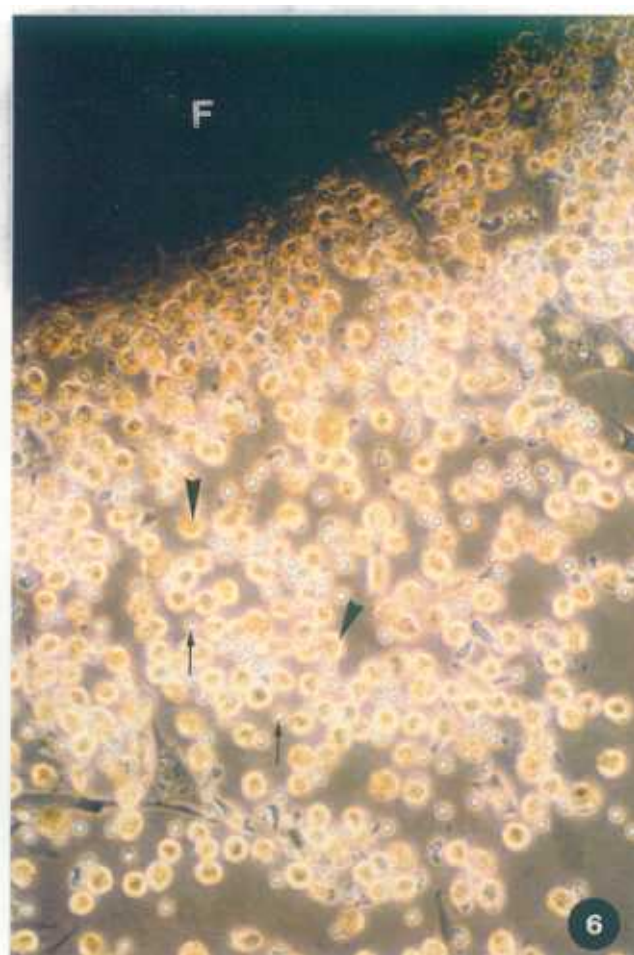


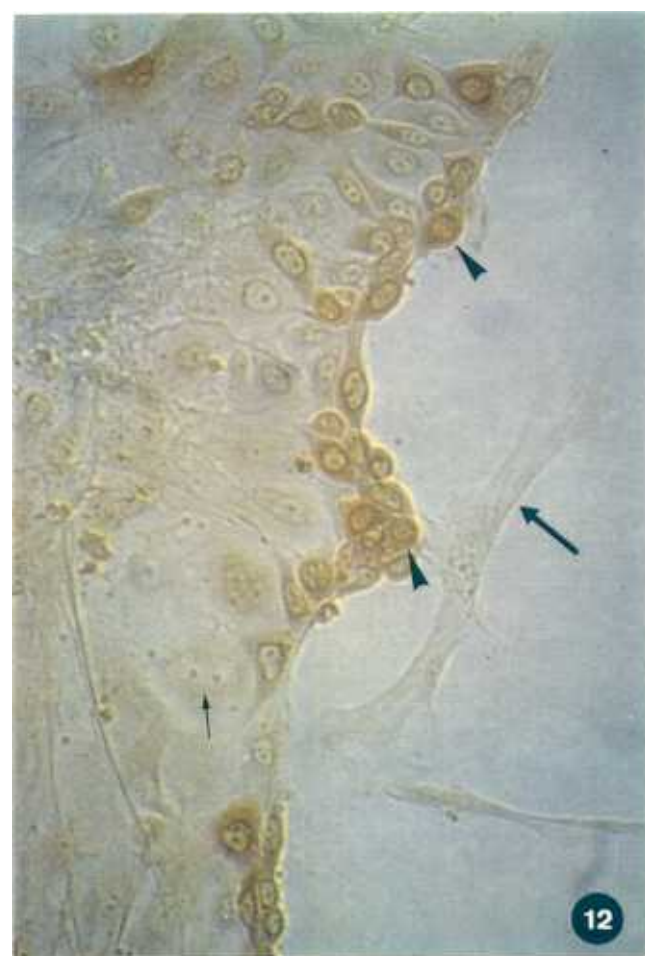
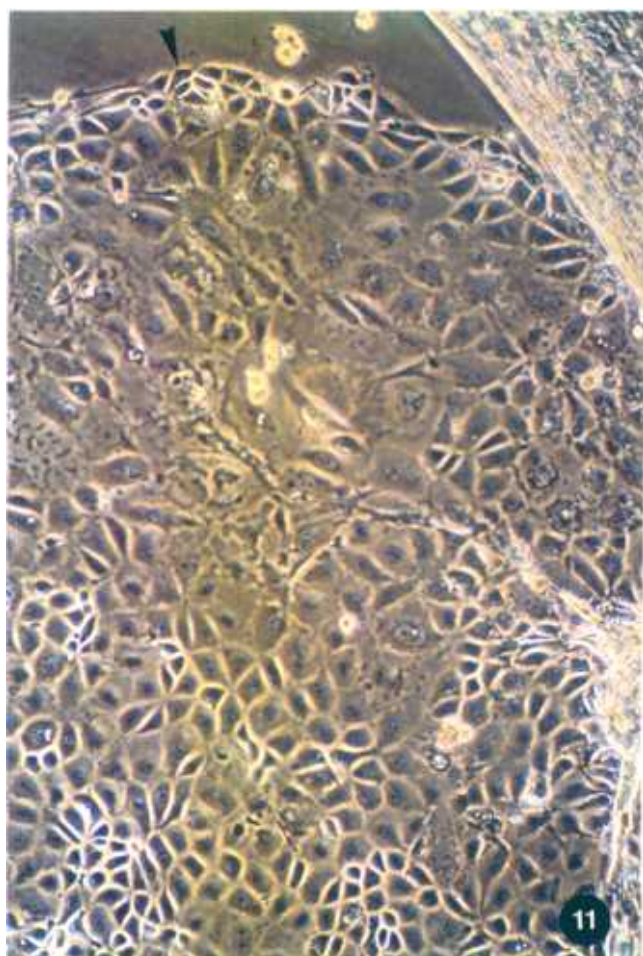
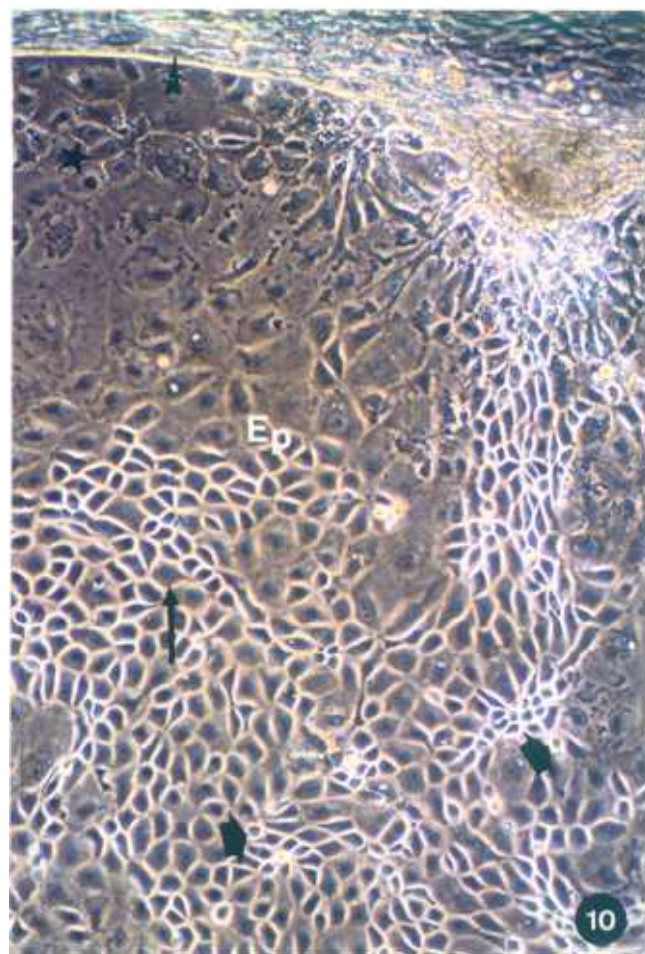
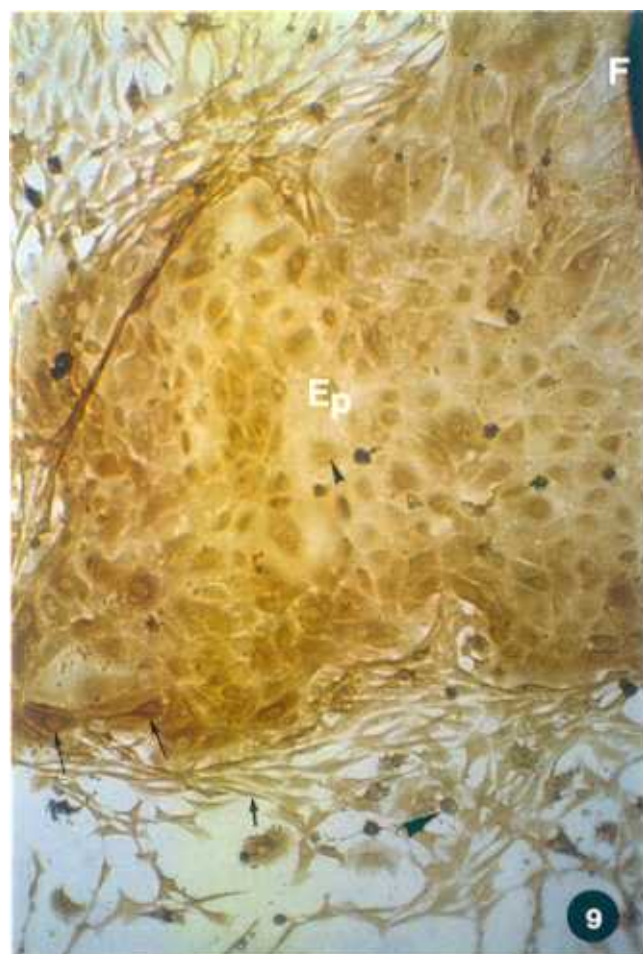
Figura 9. Colonia epitelial (Ep) organizada a partir de un fragmento tímico cultivado (F). Notar la distinta morfología de las células epiteliales en el interior y en los bordes de la colonia, así como la diferente intensidad de la expresión de moléculas del MHC de clase I (OX-18+): débil en el interior (▲) y fuerte en los bordes (↑). La expresión de clase I es también débil en los fibroblastos (↑) y fuerte en las PTR (▲). x100.

Figura 10. Colonia epitelial (Ep) que está limitada por fibroblastos (▲). Dentro de la colonia se observan células poligonales (→) y redondeadas (◼). En zonas donde el crecimiento de las células epiteliales está limitado por los fibroblastos algunas células muestran aspecto degenerado (★). x200.

Figura 11. Zona similar a la mostrada en la Fig. 10 donde se observa un borde proliferativo constituido por células epiteliales adherentes poligonales (▼). x200.

Figura 12. Límite proliferativo de una colonia epitelial formado por células redondeadas semiadherentes. La expresión de moléculas del MHC de clase II (células OX-17+) es variable en la colonia: alta en células redondeadas (▼) y casi nula en las poligonales más adherentes (↑). Los fibroblastos (↑) son negativos. x400.





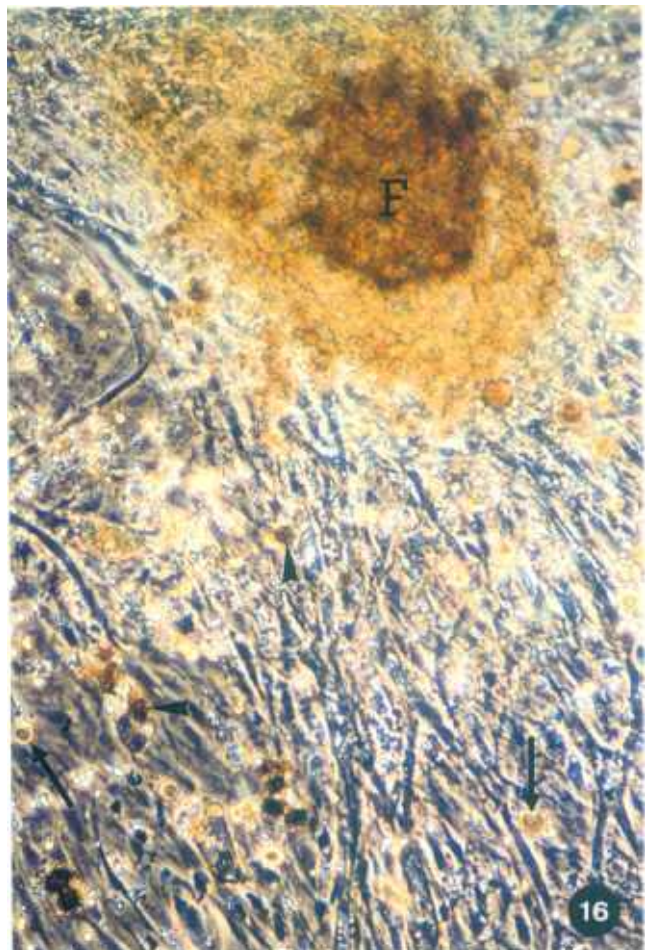
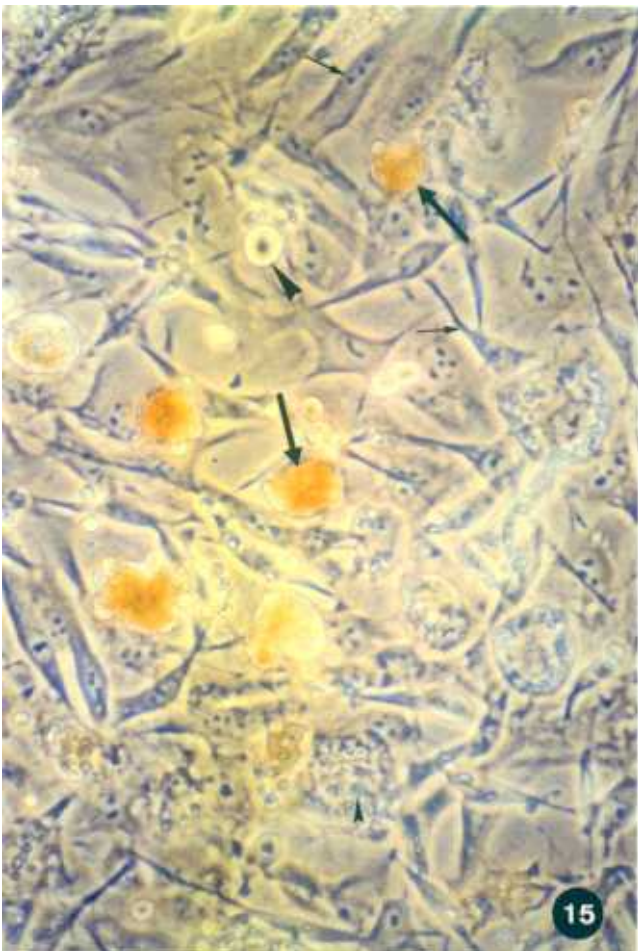
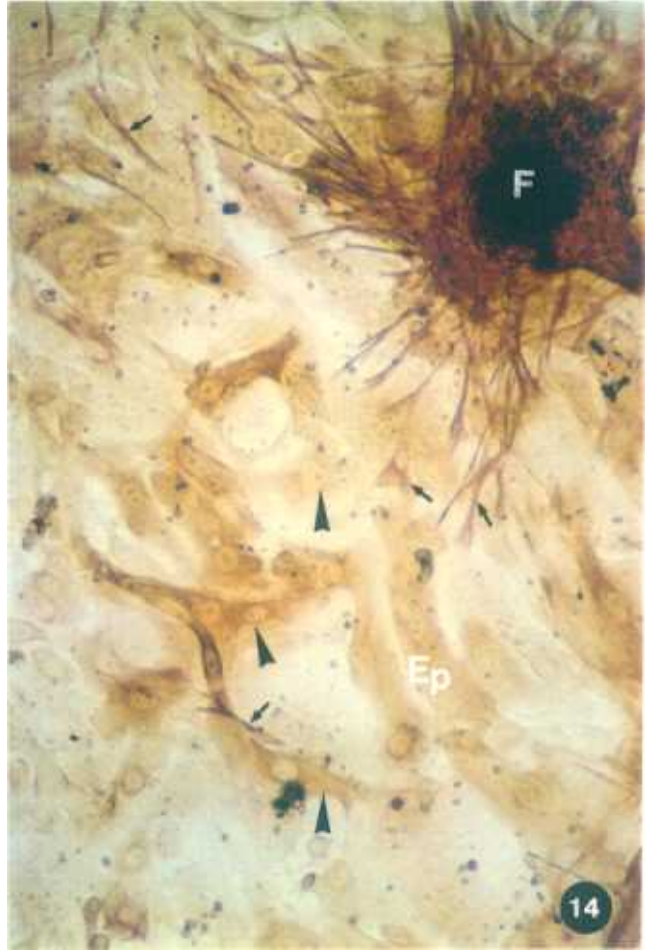
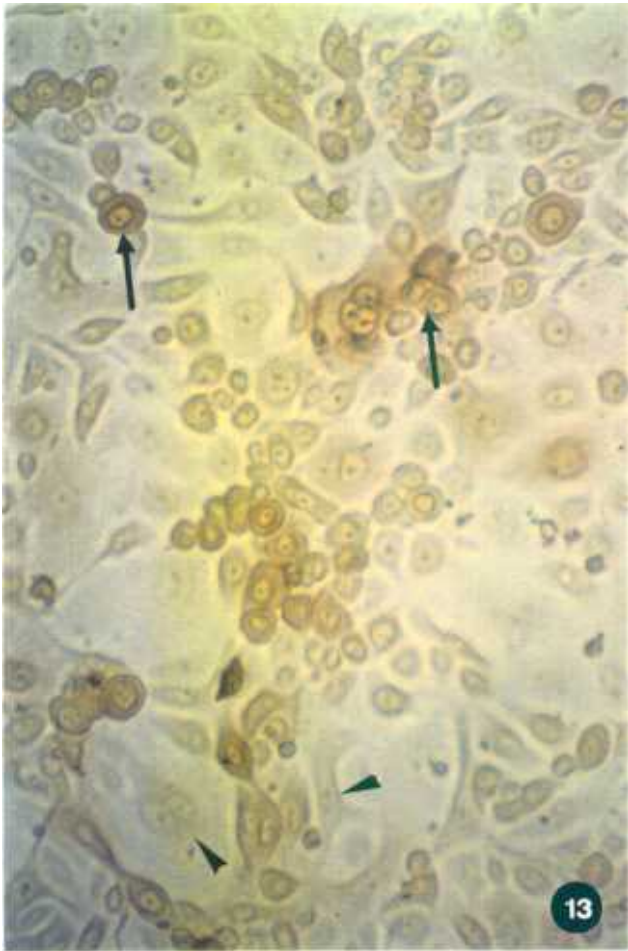
**Figura 13.** Variabilidad en la expresión de moléculas del MHC de clase II (OX-17+) en zonas internas de la colonia epitelial: alta en células semiadherentes redondeadas (→) y baja en las poligonales adherentes (▶). x200.

**Figura 14.** Doble tinción que demuestra que las únicas células dentro de la colonia epitelial son fibroblastos dispersos (→) que expresan vimentina (revelada en color rojo). Las células epiteliales que expresan citoqueratina, aparecen teñidas en color marrón (▶). Obsérvese que la intensidad de la tinción anti-citoqueratina varía de unas células a otras. x100.

**Figura 15.** Expresión de moléculas del MHC de clase II (OX-6+) en PTR: algunas son positivas (→) mientras que otras (▶), al igual que los fibroblastos (→) y macrófagos de tipo 2 (▶), son negativas. x400.

**Figura 16.** En un cultivo tardío (9-15 días) sólo algunas PTR expresan moléculas del MHC de clase II (His-19+) (▶). F, fragmento; (→) PTR negativa. x100.





**Figura 17.** Panorámica de un cultivo incluido en resina plástica en el que se observa que la expresión de moléculas del MHC de clase II (OX-6+) está restringida a la membrana citoplásmica de células dendríticas (→) pero también se observa en el citoplasma de las PTR (▶) y algunos macrófagos de tipo 1 (▷). Por el contrario, los fibroblastos (→) y otros macrófagos de tipo 1 (★) son negativos. Notar la presencia de células redondeadas de aspecto monocítico (→) con una fuerte expresión de moléculas del MHC clase II en membrana y de formas intermedias entre éstas y las dendríticas (▷) también con fuerte expresión de OX-6 en membrana. x100.

**Figura 18.** Expresión diferencial del marcador de macrófagos ED1 en PTR. En esta figura queda de manifiesto que algunas expresan este marcador (▶) mientras que otras son negativas (→). Algunas células con aspecto fibroblástico también son débilmente positivas para este marcador (★) mientras otros fibroblastos son claramente negativos (→). x400.

**Figura 19.** Las PTR positivas para ED1 expresan este marcador tanto en membrana como en vesículas intracitoplásmicas (←). x400.

**Figura 20.** Algunas PTR (←) y algunos linfocitos (→) expresan la cadena  $\alpha$  del IL-2R (células OX-39+). Los fibroblastos (←), las células epiteliales (★) y los macrófagos de tipo 1 (◄) eran negativos. x400.



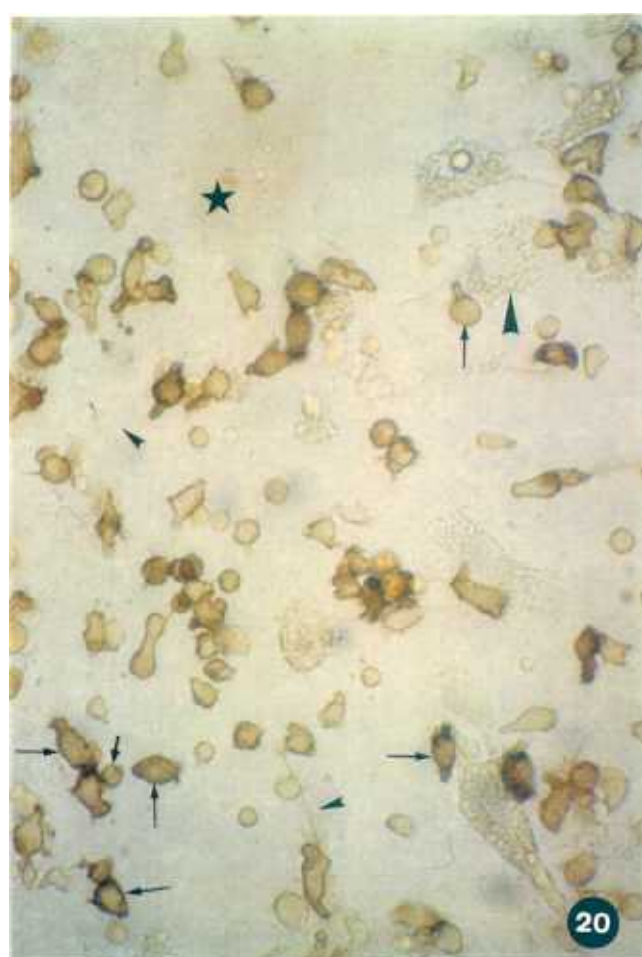
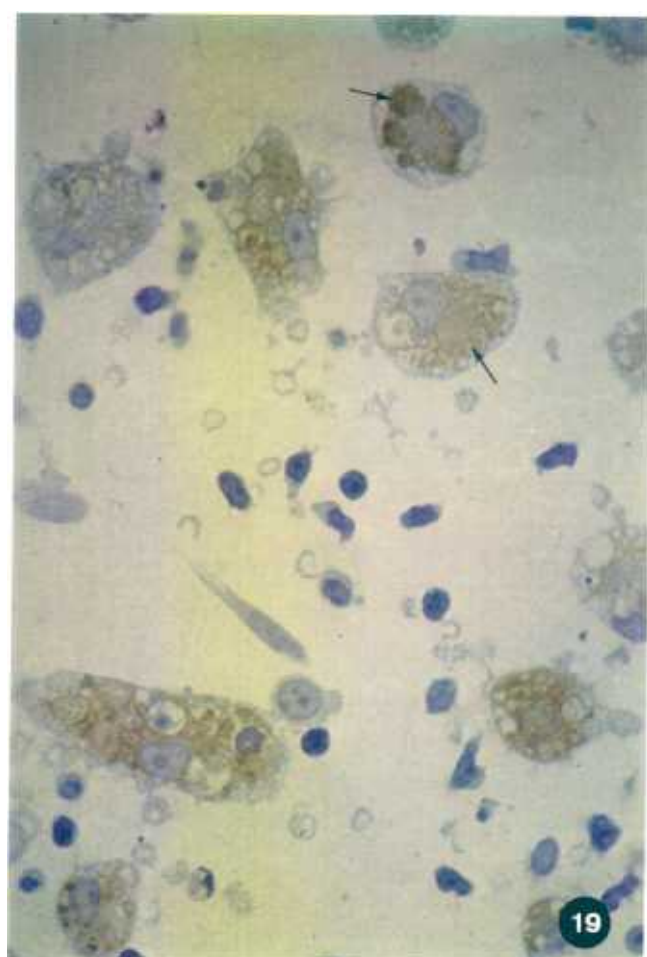
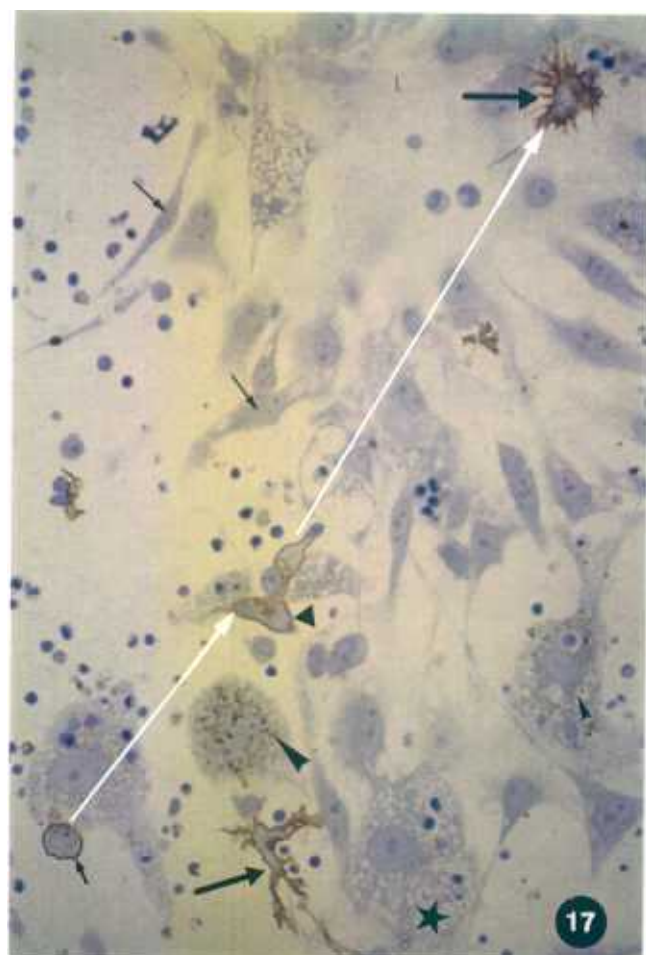


Figura 21. Expresión del antígeno detectado por el anticuerpo OX-42 en las PTR (→→). Los fibroblastos (→) y los linfocitos (▶) eran negativos. x100.

Figura 22. Las PTR (▶) fagocitan activamente partículas de carbón. x200.

Figura 23. Las PTR (▶) fagocitan levaduras teñidas con rojo neutro. El rojo neutro es liberado por las levaduras que no son fagocitadas (→) mientras que no se pierde en las que sí lo son. x400.

Figura 24. Proliferación de células APH+ a partir de un fragmento (F). El grado de positividad varía dependiendo de la adherencia de las PTR al sustrato, siendo alta en PTR redondeadas (▶) y baja en las más adherentes (→) y en los macrófagos de tipo 1 (→). x100.



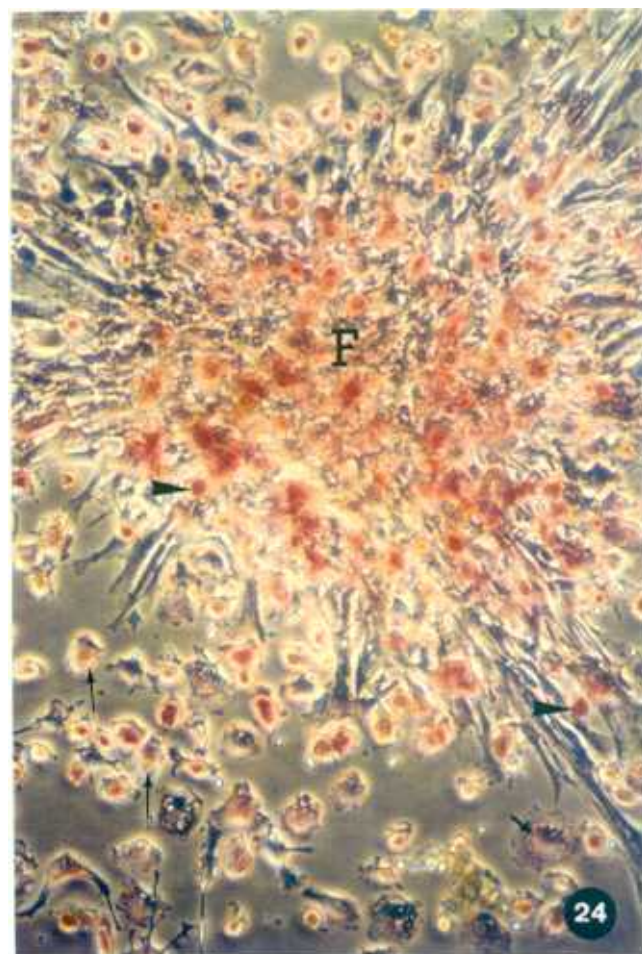
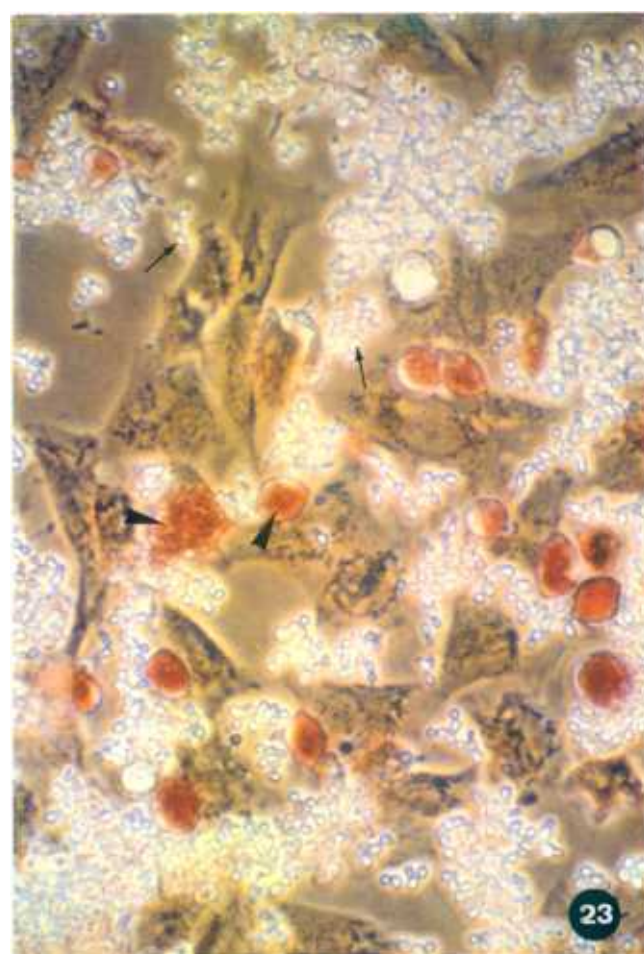
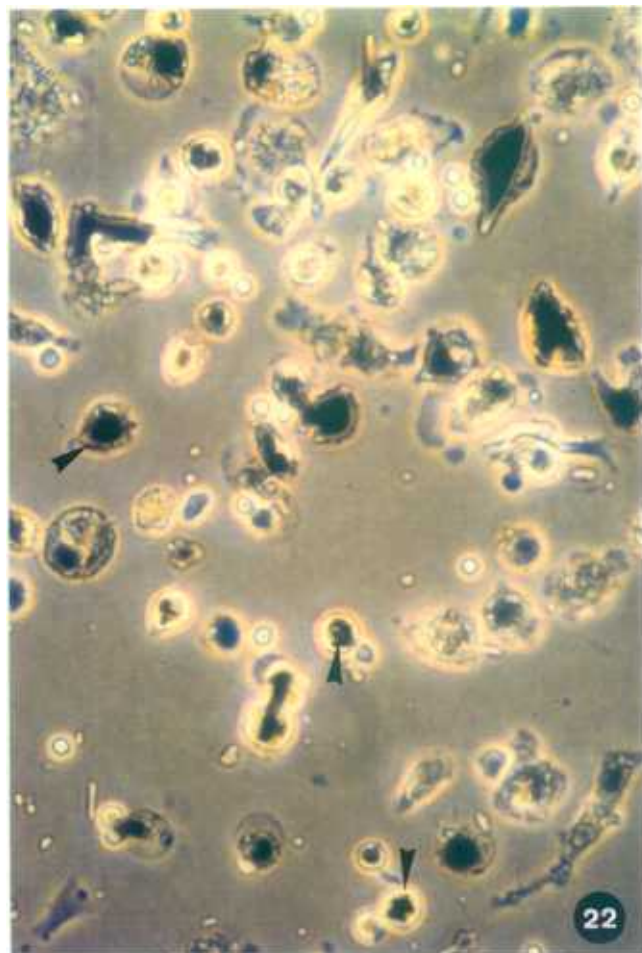
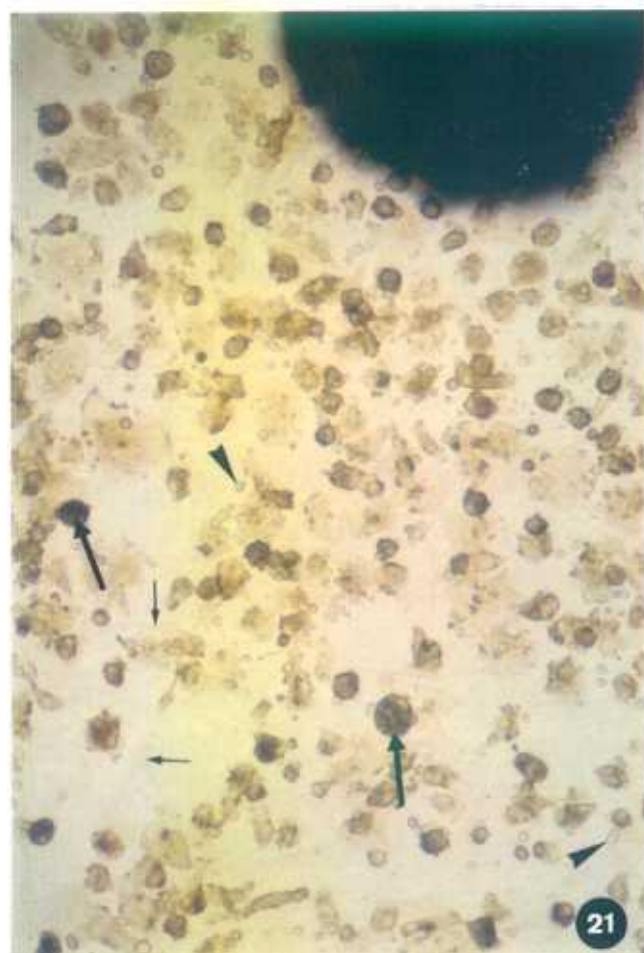


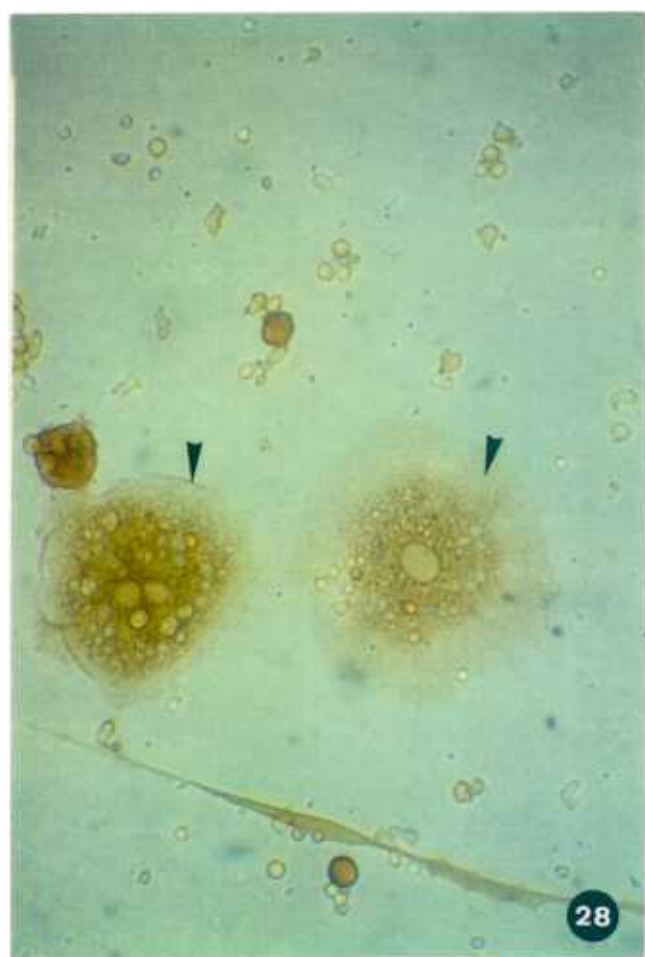
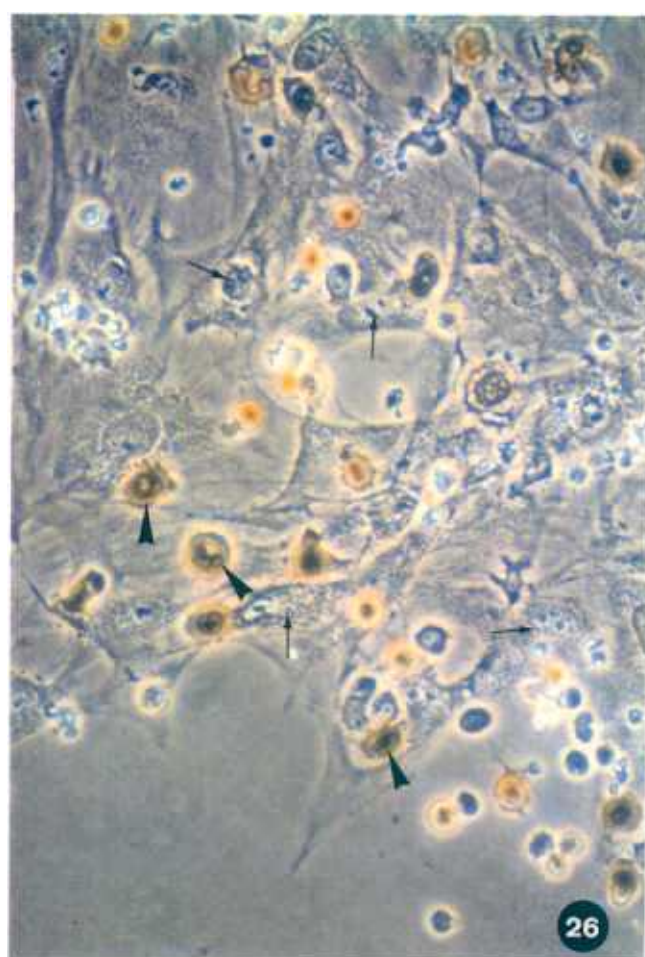
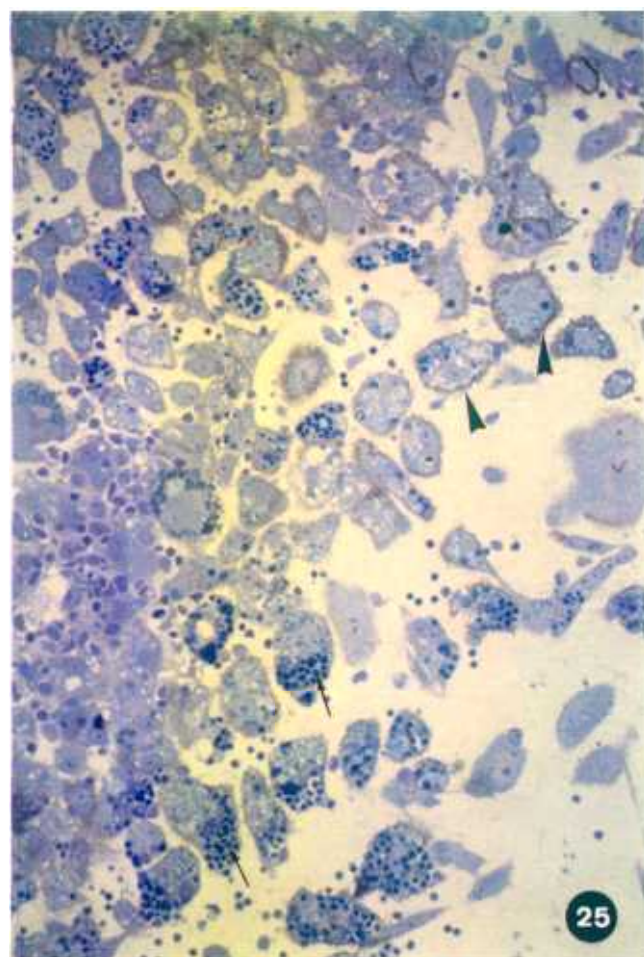
Figura 25. Panorámica de una zona del cultivo con numerosas PTR que tienen en su citoplasma numerosos linfocitos ( → ) fagocitados. Notar que la actividad NSE está predominantemente asociada a la membrana citoplásmica ( ▲ ). x200.

Figura 26. Expresión de la alta capacidad de proliferación de las PTR ( ▲ ) que se tiñen con un anticuerpo anti-BrdU. Los fibroblastos, que ya han constituido una monocapa, han dejado de proliferar ( ↑ ). x400.

Figura 27. Las PTR ( ▲ ), pero no los fibroblastos ( ↑ ) forman complejos con los linfocitos. Las PTR aparecen teñidas con el anticuerpo monoclonal ED1. x400.

Figura 28. Expresión de moléculas del MHC de clase I (OX-18+) en macrófagos de tipo 1 ( ▲ ). x400.





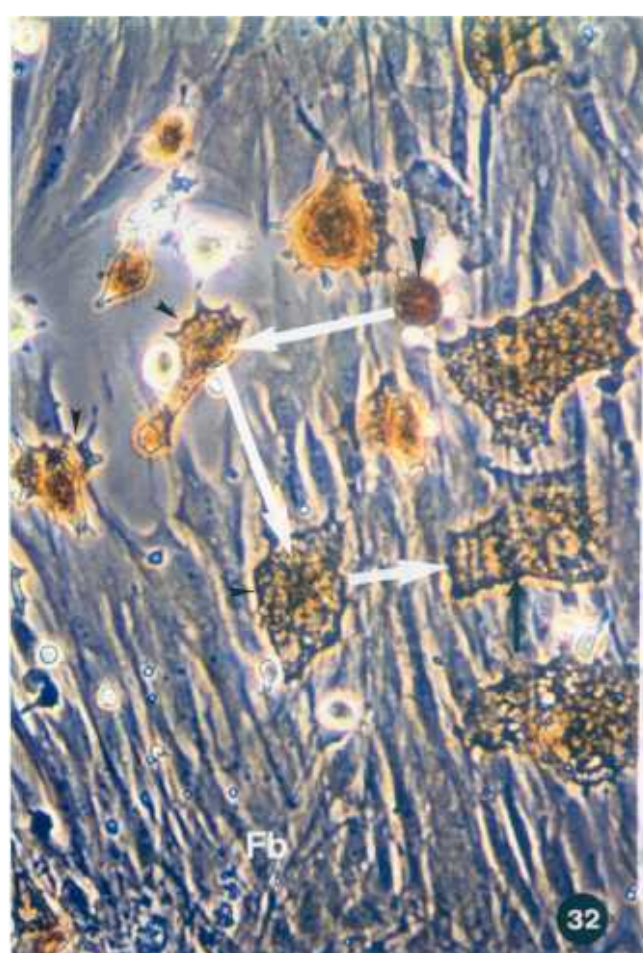
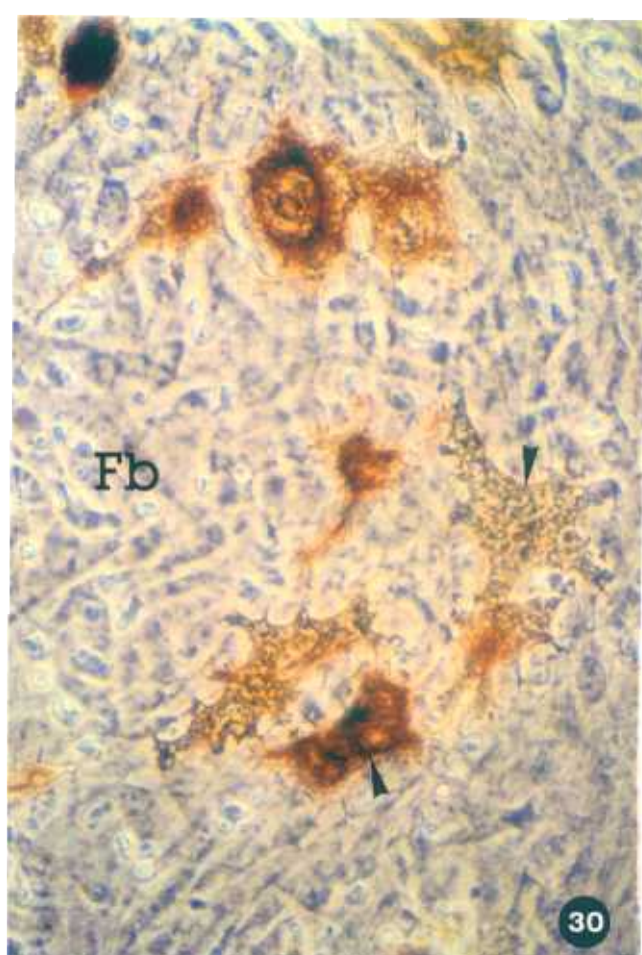
**Figura 29.** Expresión del marcador ED2 en macrófagos de tipo 1. Obsérvese la existencia de macrófagos positivos (▲) y negativos (↑). También se observan PTR positivas (↑) y negativas (▲) para este marcador. x400.

**Figura 30.** Macrófagos de tipo 2, ED2+ (▲) sobre monocapa de fibroblastos (Fb), que son negativos para este marcador. x400.

**Figura 31.** La expresión de la actividad enzimática APH varía en PTR (alta, ▲), macrófagos de tipo 1 (baja, ↑) y formas intermedias entre ellos (media, ▲). x200.

**Figura 32.** Expresión de ED1 en PTR (▲), macrófagos tipo 2 (↑) y formas intermedias entre ambos (▲). Fb, fibroblasto. x200.





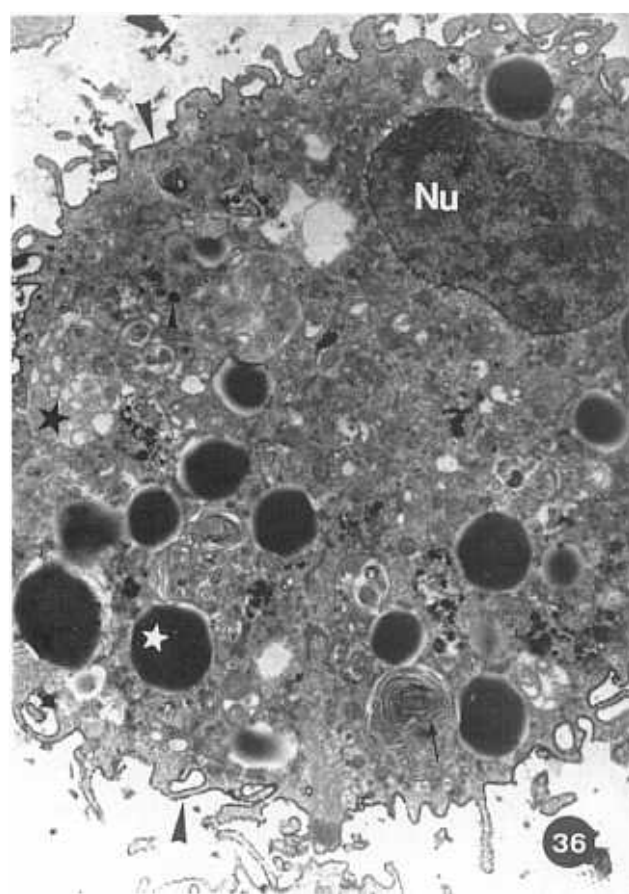
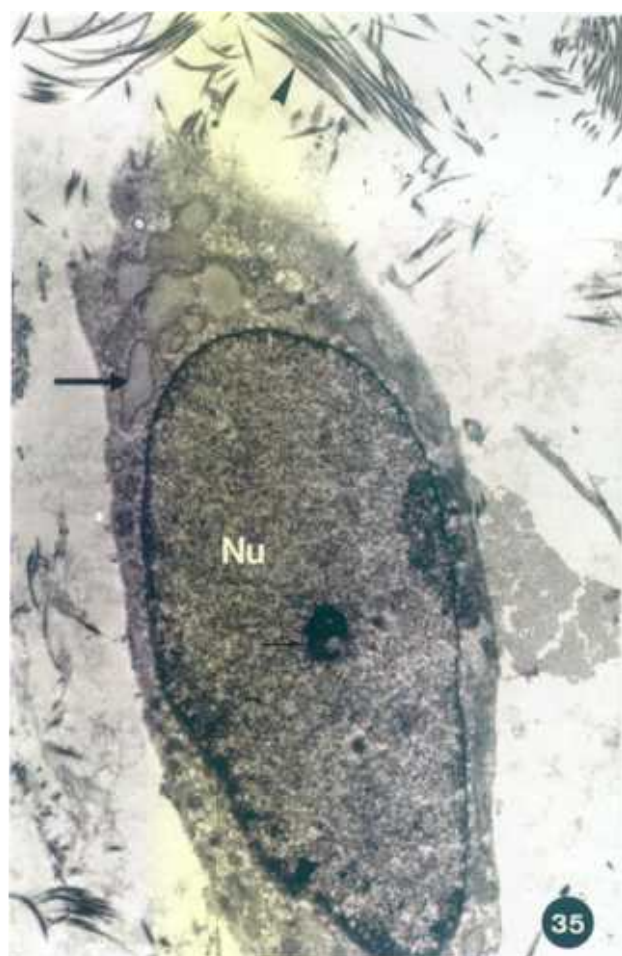
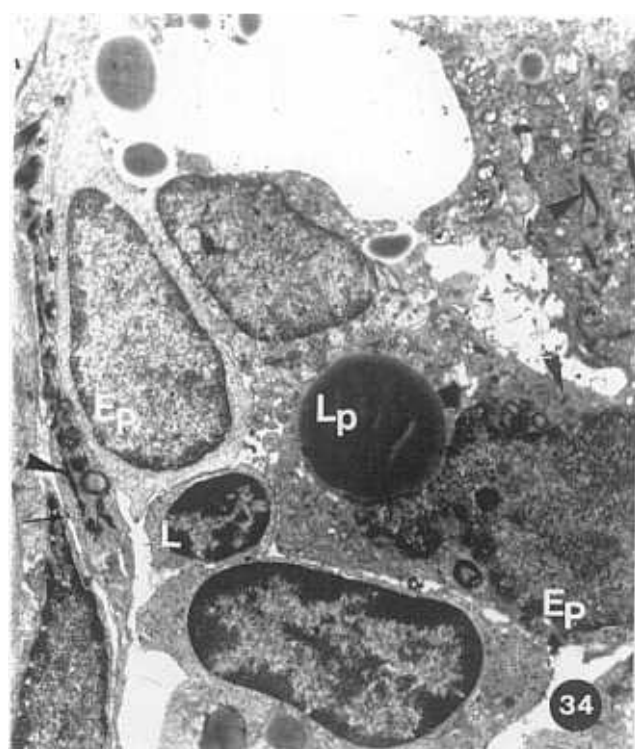
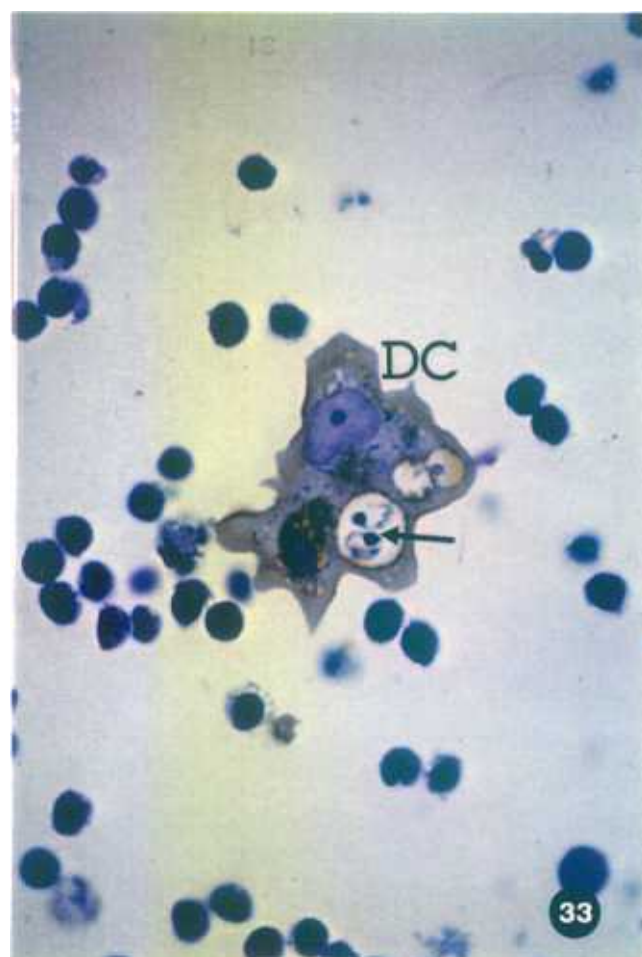
**Figura 33.** Célula dendrítica fuertemente positiva para moléculas del MHC de clase II (OX-6+) que muestra material fagocitado en su citoplasma (←). x1.000.

**Figura 34.** Vista panorámica de un cultivo primario de 6 días donde se pueden observar linfocitos vivos (L). Las células epiteliales (Ep), unidas por desmosomas (←), poseen tonofilamentos formando grandes haces (◄) y, en ocasiones, inclusiones lipídicas (Ip). x5.500.

**Figura 35.** Fibroblasto en un cultivo primario de 6 días. En el citoplasma se observan algunas cisternas dilatadas de RER (←) y, alrededor, numerosas fibras colágenas (◄). Nu, núcleo; (←) nucléolo. x9.000.

**Figura 36.** PTR en un cultivo primario de 10 días. La actividad NSE se localiza preferentemente en la membrana citoplásmica (◄). En el citoplasma se pueden observar numerosos cuerpos multivesiculados (★), gotas lipídicas (★), figuras de mielina (←) y gránulos (➤). Nu, núcleo. x5.000.





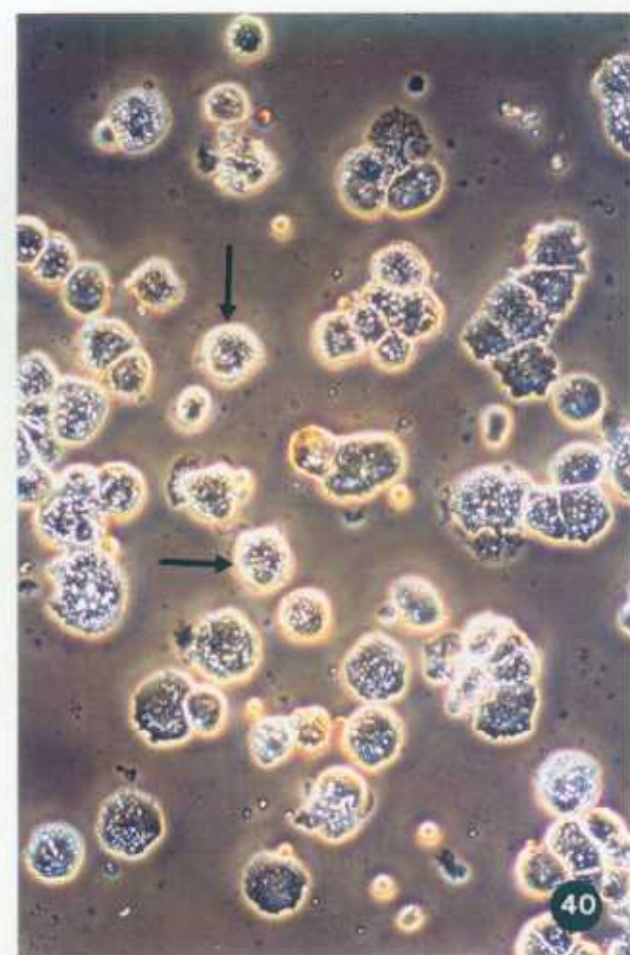
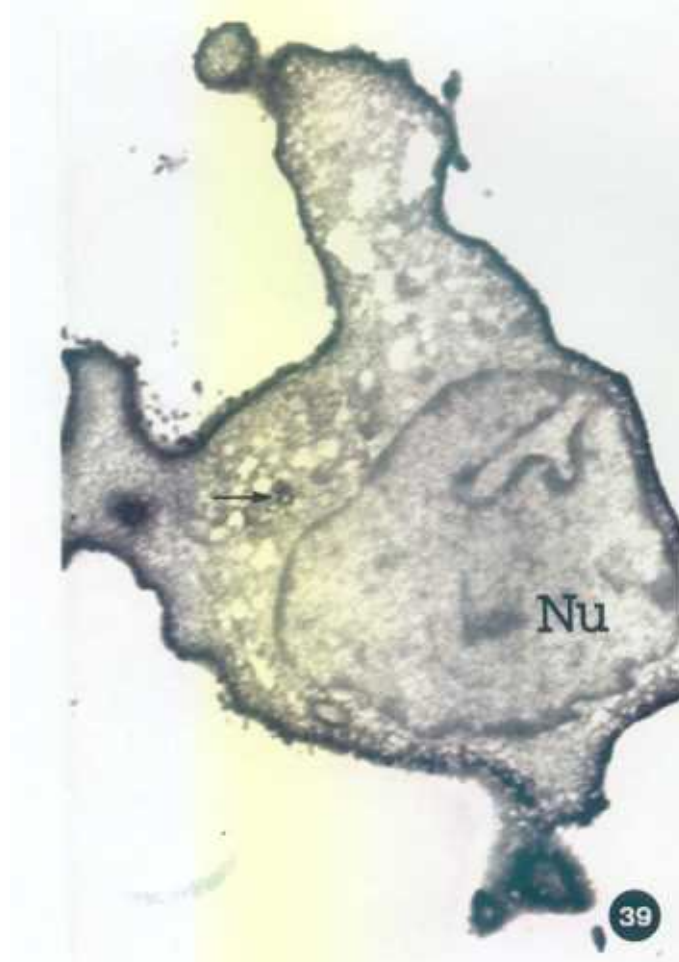
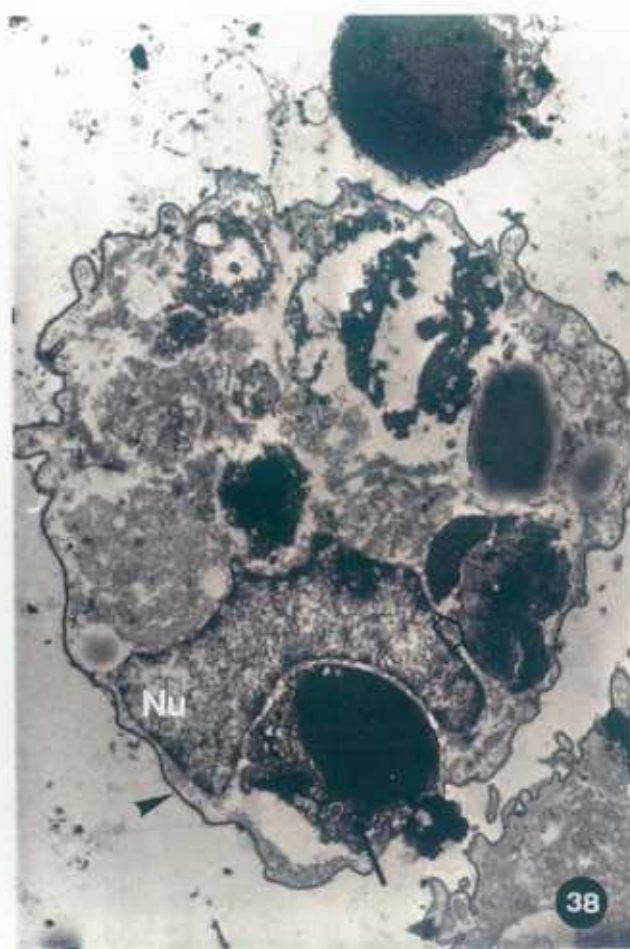
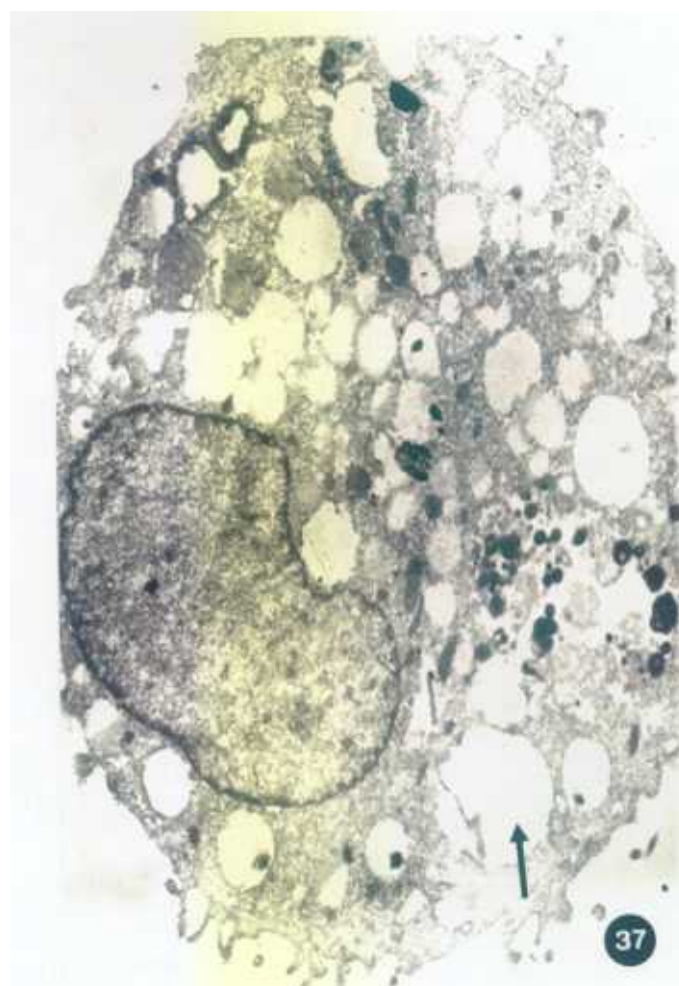
**Figura 37.** PTR negativa para OX-6 (anticuerpo dirigido contra moléculas del MHC de clase II) en un cultivo primario de 5 días. Obsérvese la gran cantidad de vacuolas vacías presentes en su citoplasma (→). x14.000.

**Figura 38.** Macrófago de tipo 1 positivo para la actividad enzimática NSE (▲) en un cultivo primario de 10 días. En el citoplasma se observan abundantes restos degenerados (◻) e incluso células completas fagocitadas (→). Nu, núcleo. x6.500.

**Figura 39.** Célula dendrítica que expresa fuertemente moléculas del MHC de clase II en un cultivo primario de 6 días. Presentan un núcleo (Nu) irregular y algunos gránulos en el citoplasma (→). x14.000.

**Figura 40.** Macrófagos (→) aislados de la fracción de baja densidad (día 1) tras citocentrifugación y observación a microscopía de contraste de fase. Se aprecia la abundancia de pequeñas vesículas en su citoplasma. x200.





**Figura 41.** Expresión del antígeno detectado por el anticuerpo OX-42 en macrófagos aislados de día 1. x1.000.

**Figura 42.** Expresión de ED1 en macrófagos aislados de día 1. x1.000.

**Figura 43.** Expresión de moléculas del MHC de clase II en macrófagos cultivados durante 30 días. La tinción se realizó con una mezcla de los anticuerpos OX-6 y OX-17. x200.

**Figura 44.** Expresión de moléculas del MHC de clase II en macrófagos cultivados de día 30 tras el tratamiento con rIL-2. La tinción se realizó con una mezcla de los anticuerpos OX-6 y OX-17. x200.

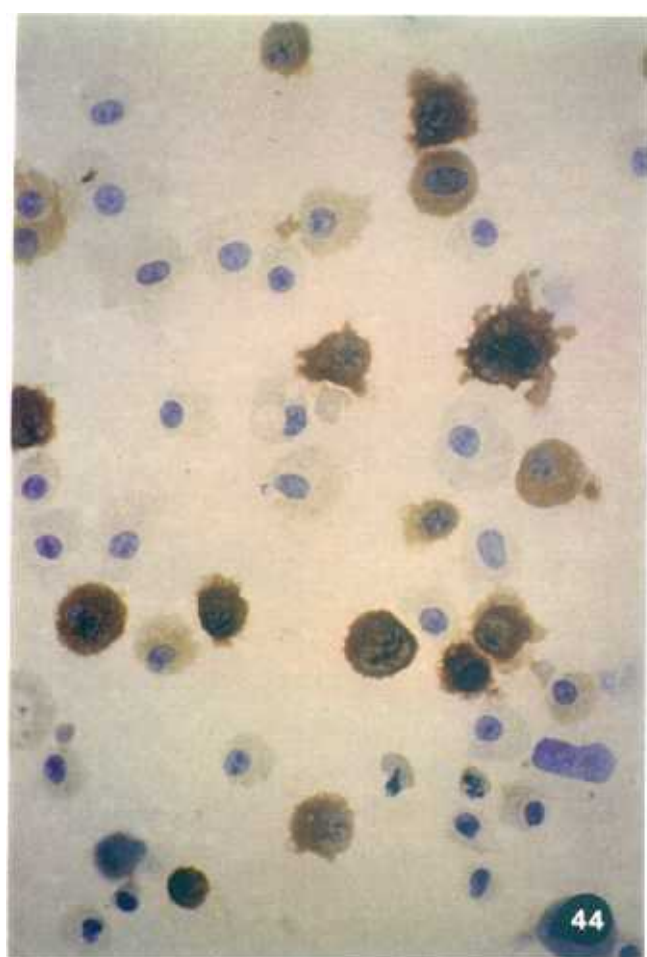
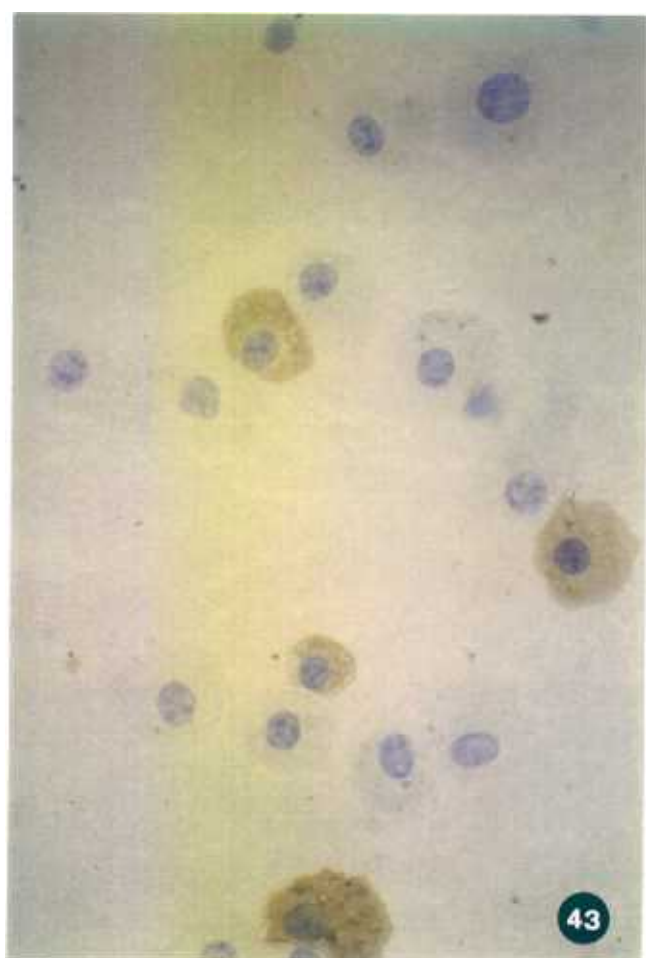
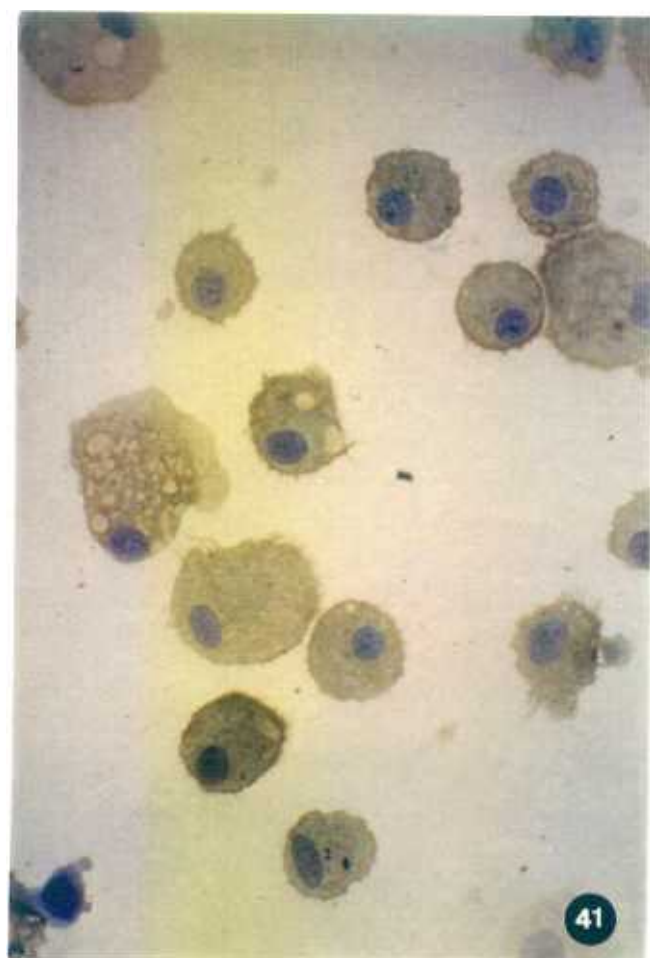




Figura 45. Expresión de la cadena  $\alpha$  del IL-2R (células OX-39+) en macrófagos cultivados de día 30 tras el tratamiento con rIL-2. x400.

Figura 46. Expresión de Thy-1 (células OX-7+) en macrófagos de día 30, cultivados en medio control. x200.

Figura 47. Expresión de Thy-1 (OX-7+) en macrófagos cultivados de día 30 tras el tratamiento con Con A-SCM. x1.000.

Figura 48. Morfología de las células dendríticas ( $\blackleftarrow$ ) aisladas de la fracción de baja densidad (día 1) tras citocentrifugación y observación a microscopía de contraste de fase. x100.



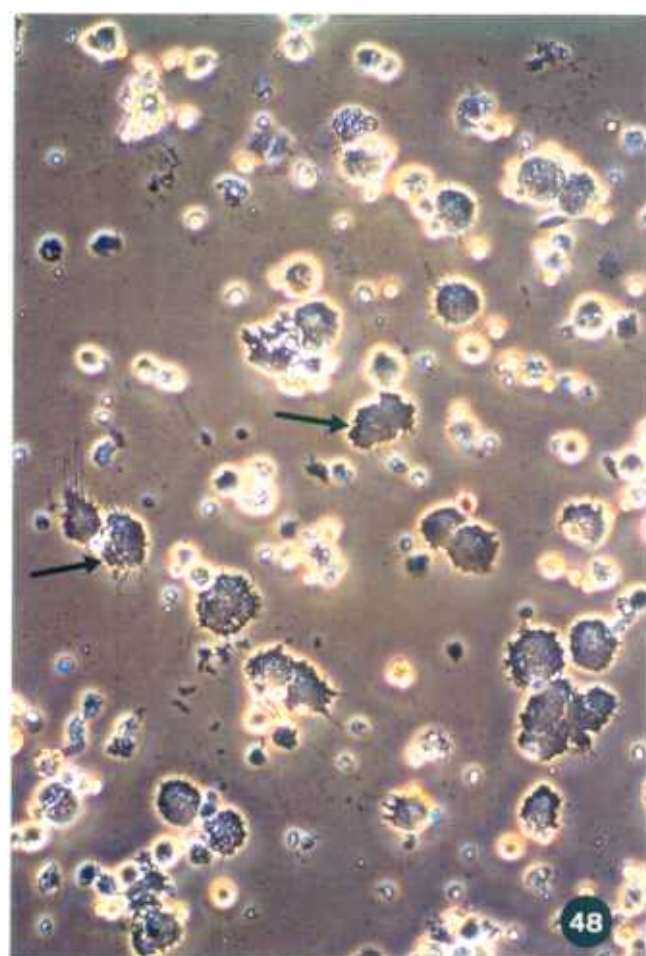
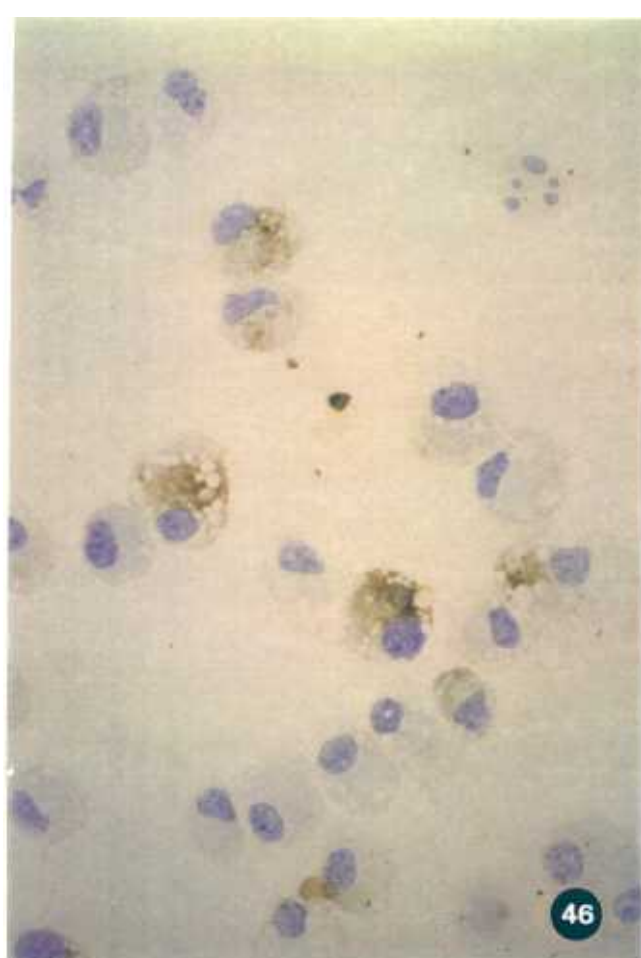
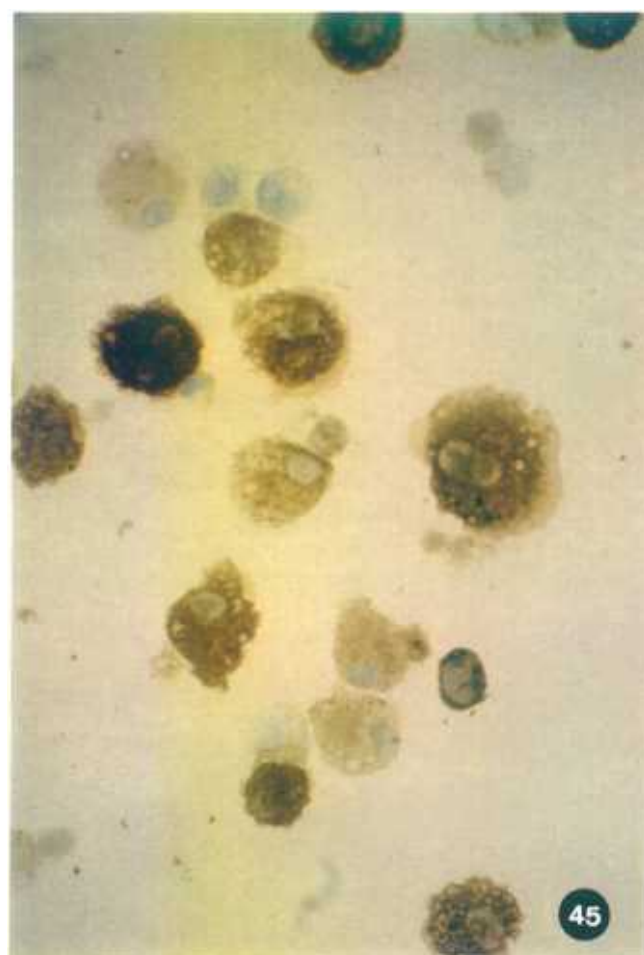


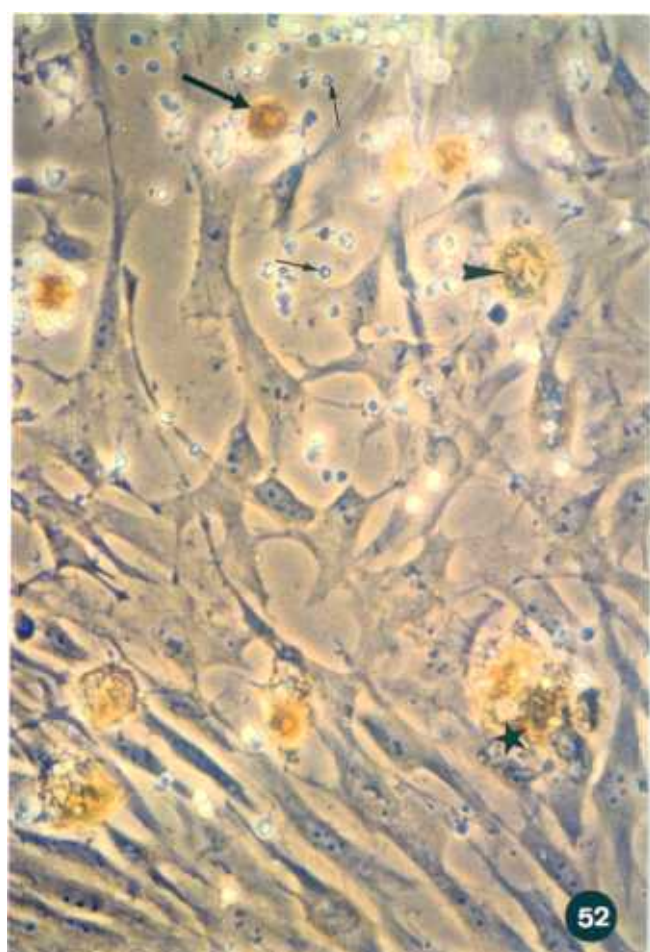
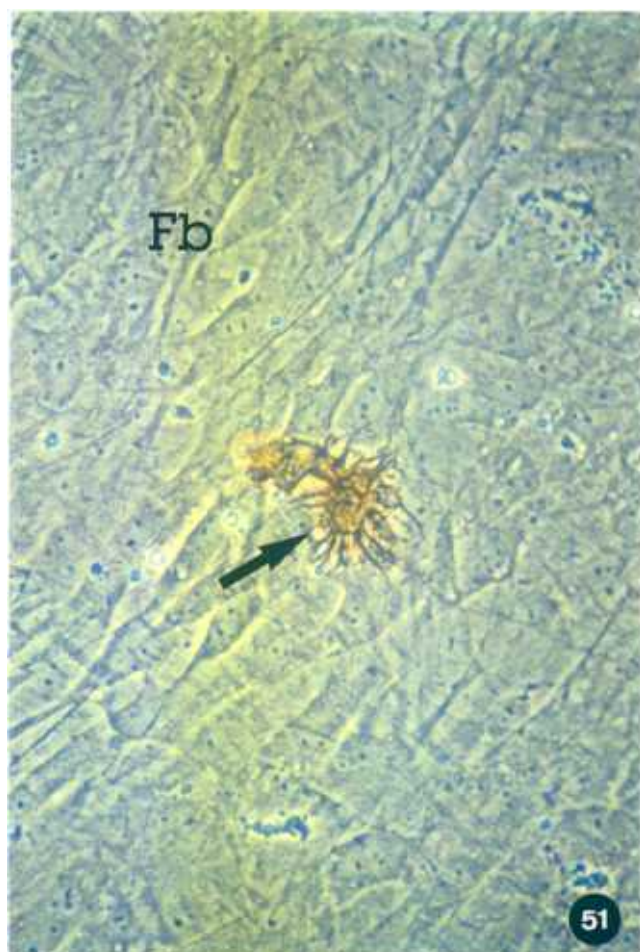
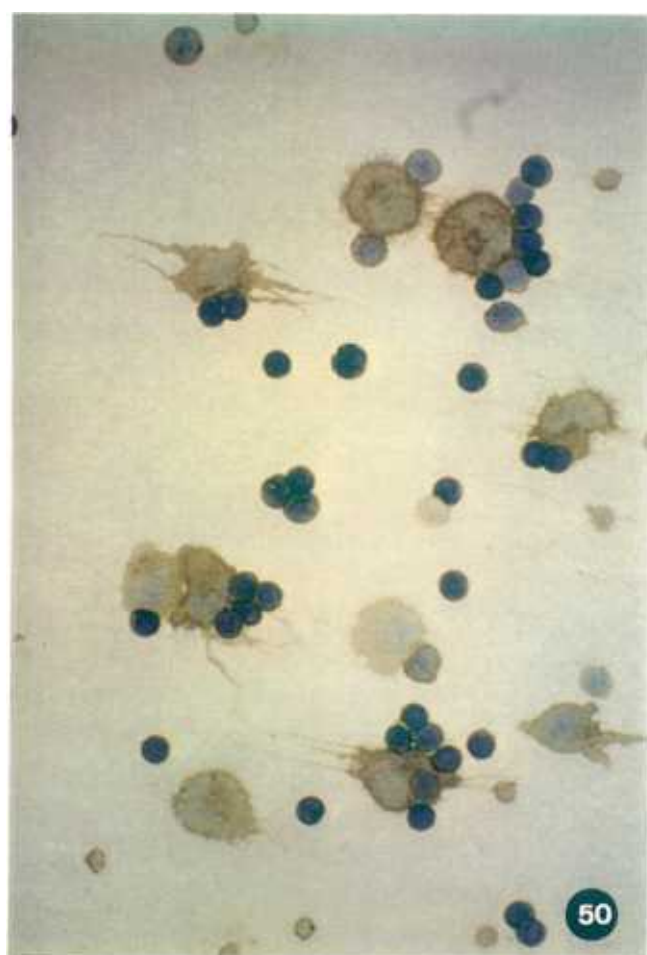
Figura 49. Expresión de moléculas del MHC de clase II en DC aisladas de día 1. La tinción se realizó con una mezcla de los anticuerpos OX-6 y OX-17. x1.000.

Figura 50. Expresión de Thy-1 (OX-7+) en DC aisladas de día 1. x200.

Figura 51. Cultivo de estroma tímico de rata tratado con dGuo 1,35mM durante 10 días en el que se observa una célula dendrítica (➡➡), sobre una monocapa de fibroblastos (Fb), con una alta expresión de moléculas del MHC de clase II (células His-19+). x400.

Figura 52. PTR (↔) y macrófagos de tipo 1 (◄) y 2 (★) en un cultivo tratado con dGuo 1,35mM durante 5 días positivos para ED1. Se observan linfocitos picnóticos (←). x200.





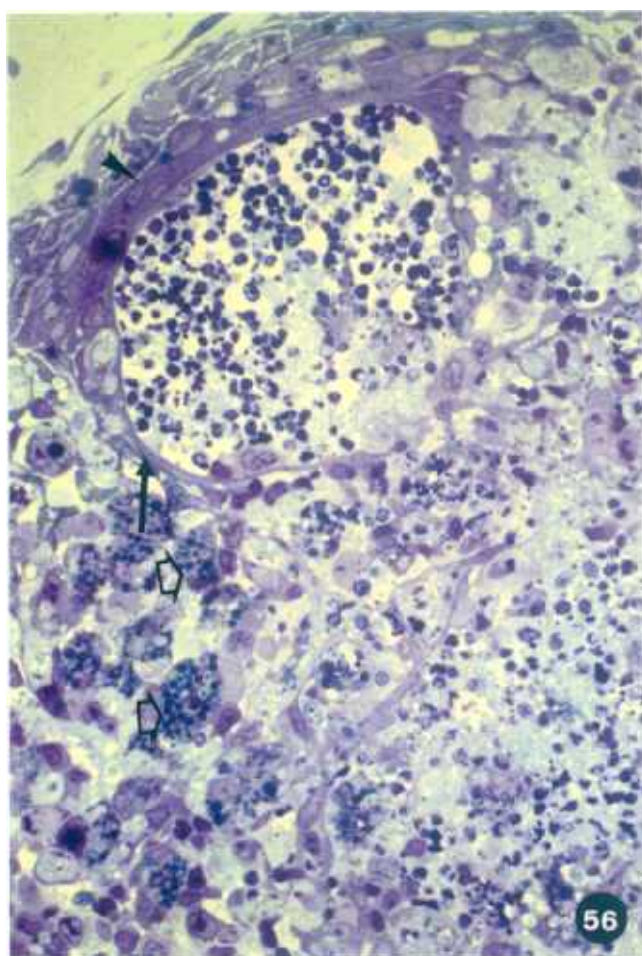
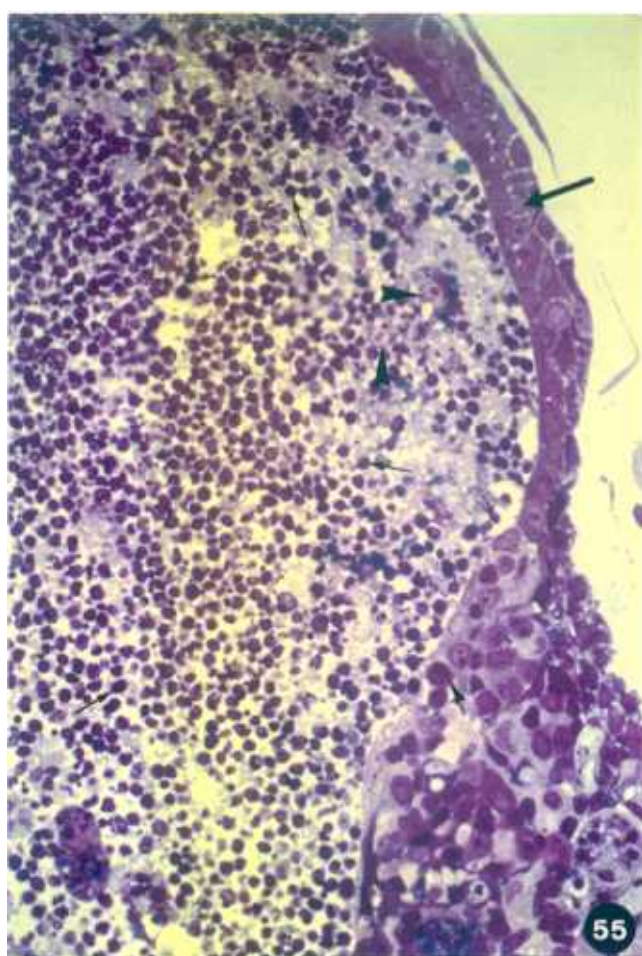
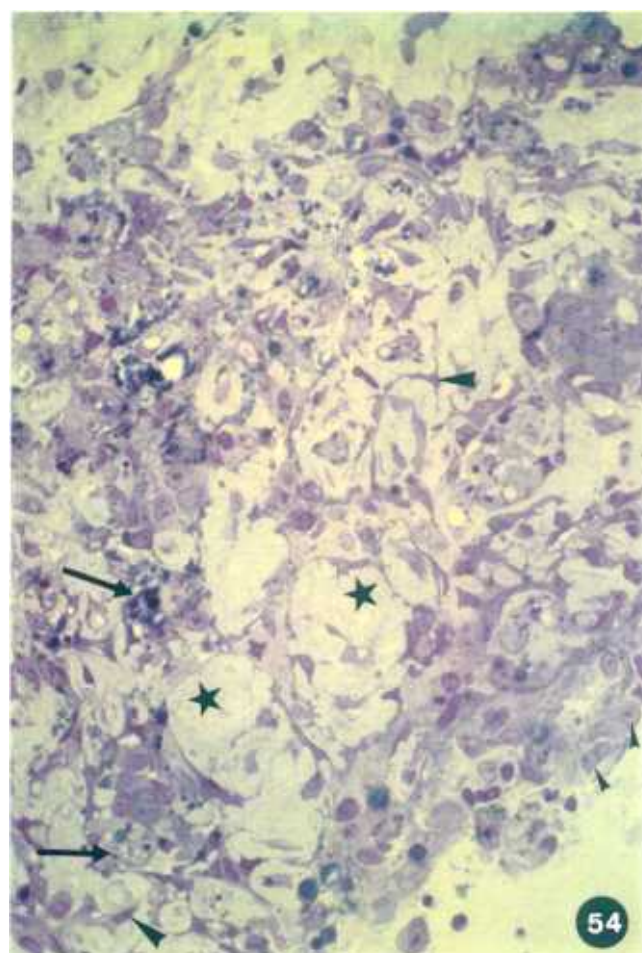
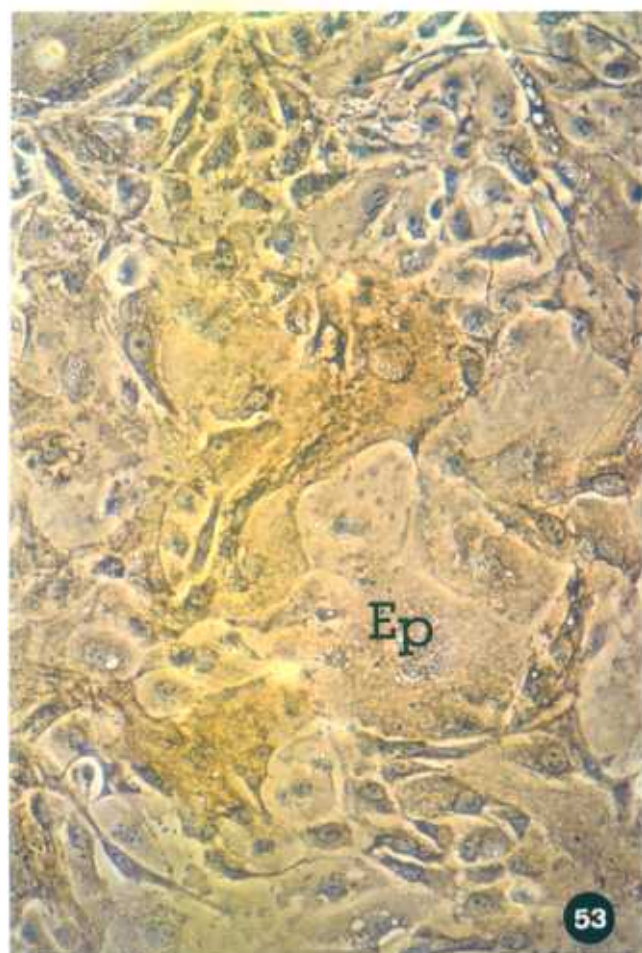
**Figura 53.** Colonia de células epiteliales (Ep) en un cultivo tratado con dGuo 1,35mM durante 7 días. La expresión de citoqueratina varía en distintas zonas de la colonia, como en los cultivos control. x100.

**Figura 54.** Fragmento tímico de rata cultivado adherido al soporte de cultivo en medio control durante 5 días. El predominio corresponde a fibroblastos (▲) y células macrofágicas (→) dispersas entre masas de colágeno (★) frente al componente epitelial (▲). x200.

**Figura 55.** Fragmento tímico de rata cultivado adherido al soporte de cultivo tratado con dGuo 1,35mM en el que se observan varias capas de células epiteliales en el borde del fragmento (→). En el interior se distinguen algunas células de de núcleo claro, cromatina perinuclear y nucléolos patentes, posiblemente también de naturaleza epitelial (▲) además de numerosos linfocitos necróticos (↑). En otras zonas, no obstante, también se pueden observar algunos linfoblastos (▲). x400.

**Figura 56.** Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo tratado con dGuo 1,35mM durante 5 días donde se observan células epiteliales que limitan el fragmento (▲) y otras que se prolongan hacia el interior del mismo (→). Se observan también células macrofágicas (◻) similares a las PTR de la monocapa de los cultivos, con numerosas vesículas citoplásmicas y linfocitos degenerados en su citoplasma. x400.





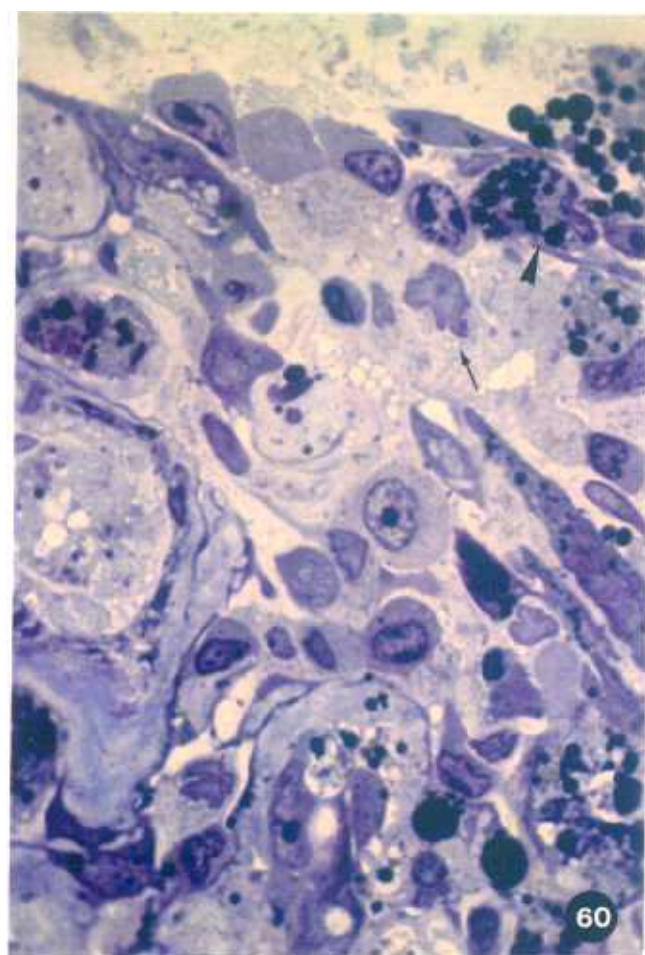
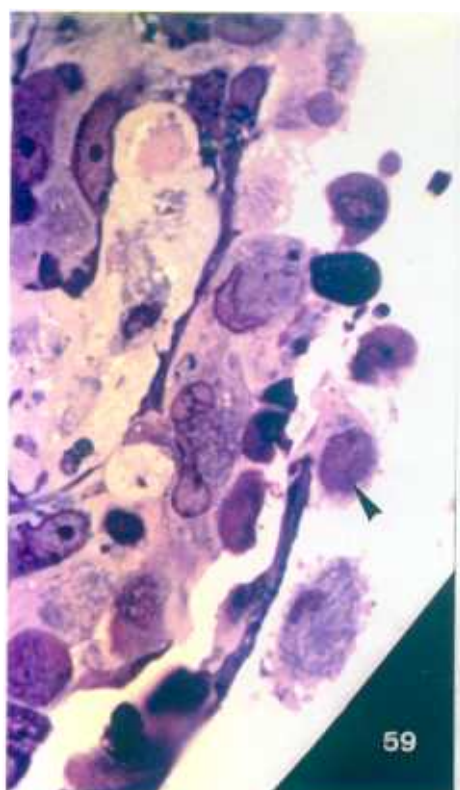
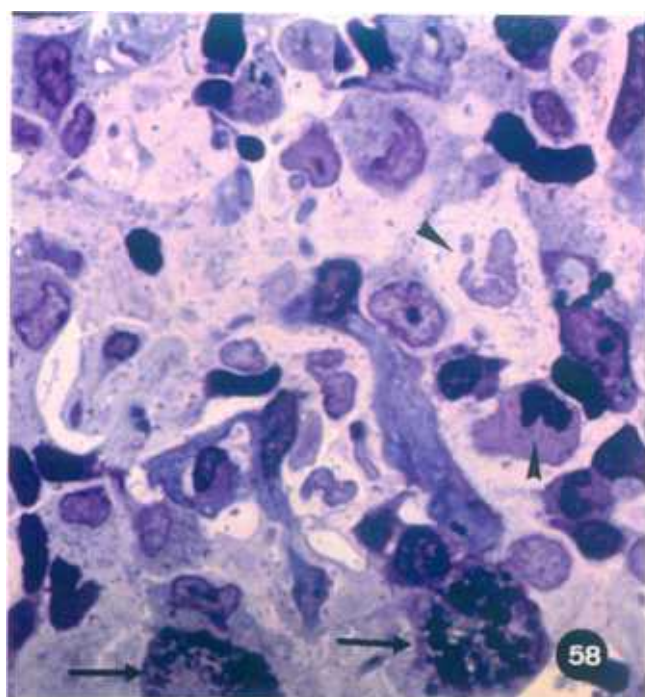
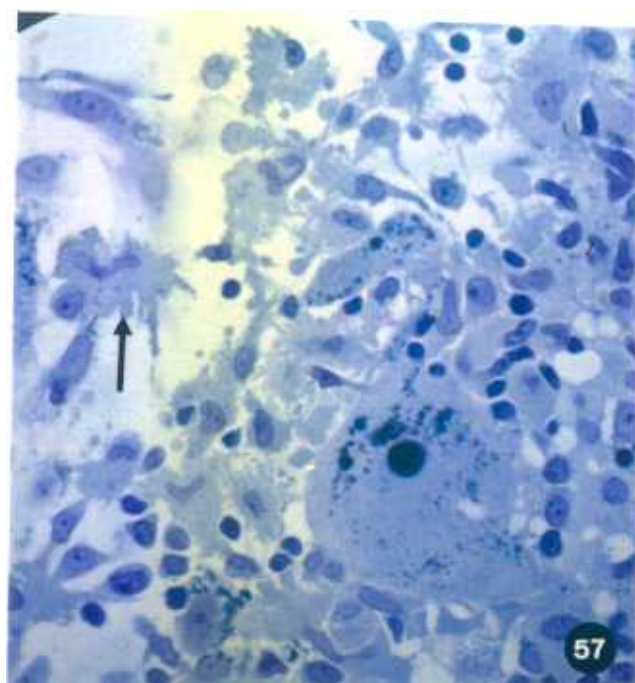
**Figura 57.** Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo en medio control durante 5 días en cuyos límites se observan células dendríticas (→) con núcleo irregular y citoplasma claro que expresan moléculas del MHC de clase II (OX-6+). x400.

**Figura 58.** Detalle de un fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo tratado con dGuo 1,35mM durante 5 días en el que se observan macrófagos (→), blastos (➤) y células de citoplasma claro con núcleo irregular y gránulos perinucleares, similares a las IDC (▲). x1.000.

**Figura 59.** Detalle del borde de un fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo tratado con dGuo 1,35mM durante 5 días en el que se aprecian células de aspecto monocítico (◄) en la proximidad del fragmento. x1.000.

**Figura 60.** Interior de un fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo tratado dGuo 1,35mM durante 5 días en el que hay macrófagos (➤) y células de citoplasma claro (←) con características similares a las IDC observadas in situ en el timo de rata o a las de células epiteliales de la médula tímica. x1.000.





**Figura 61.** Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo en medio control durante 5 días. Se observan células epiteliales (Ep) en la parte más externa del borde del fragmento formando capas aplanadas. Notar las cisternas de RER ( ► ) y la presencia, en algunas de ellas, de gránulos densos a los electrones ( —→ ) grandes. x24.000

**Figura 62.** Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo en medio control durante 5 días. Células epiteliales (Ep) en la zona más interna del borde del fragmento. ( —→ ), RER; ( ◀ ), gránulos; ( —→ ), desmosomas. x34.000.

**Figura 63.** Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control. Se observan desmosomas incipientes ( ⌘ ) entre las células epiteliales del borde del fragmento. x90.000.

**Figura 64.** Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control. Algunas de las células epiteliales (Ep) del borde del fragmento presentan formas irregulares con prolongaciones y restos fagocitados ( ← ) pero mantienen los característicos gránulos ( ◀ ) densos a los electrones y las cisternas dilatadas de RER ( ► ). x30.000.



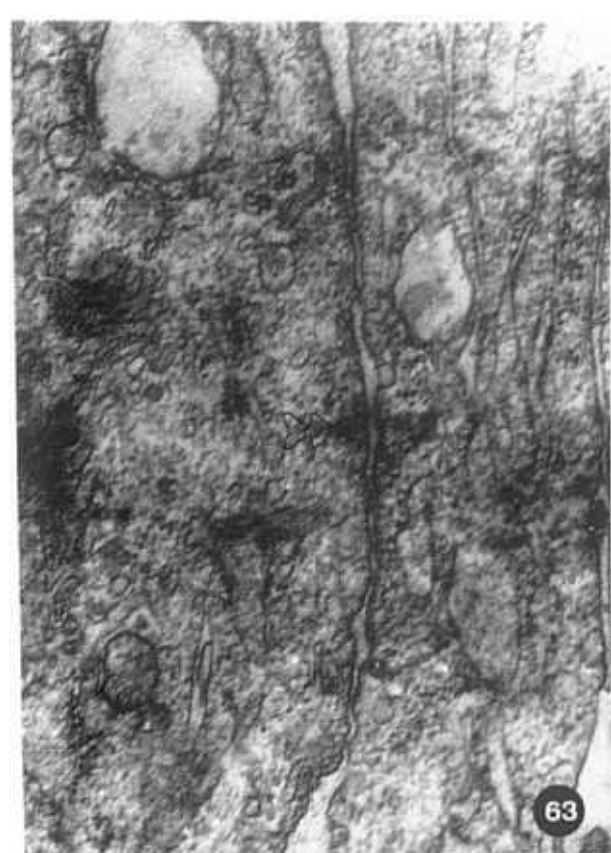
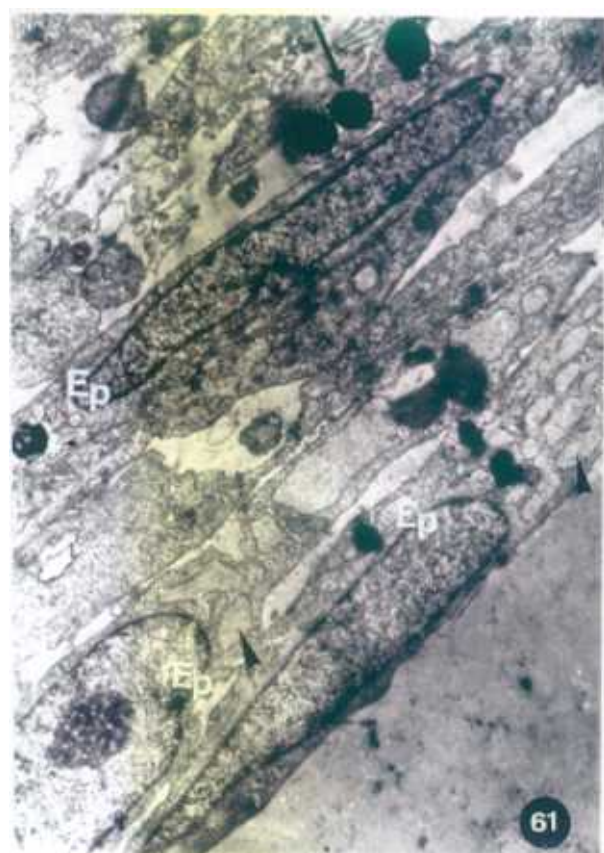


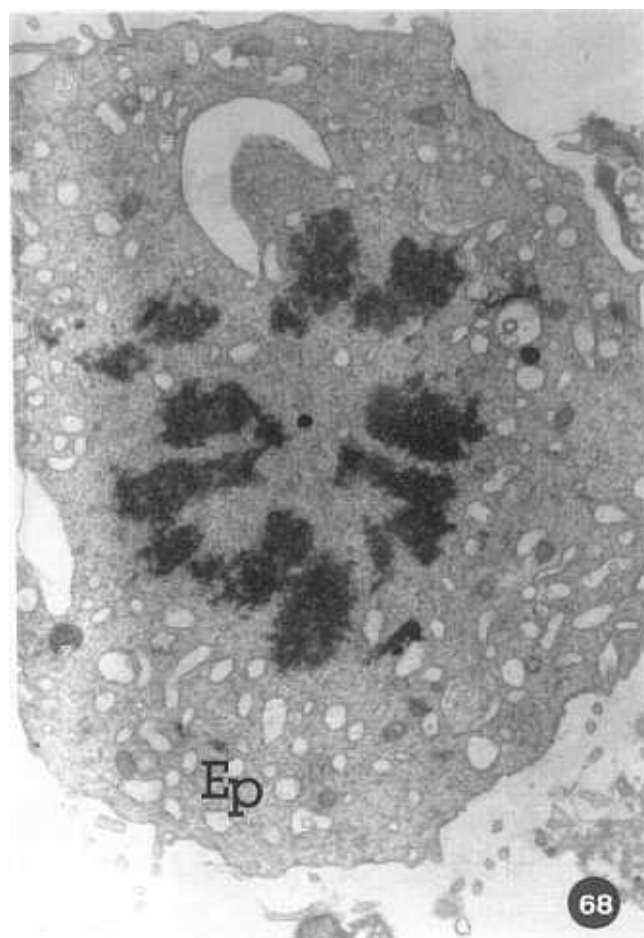
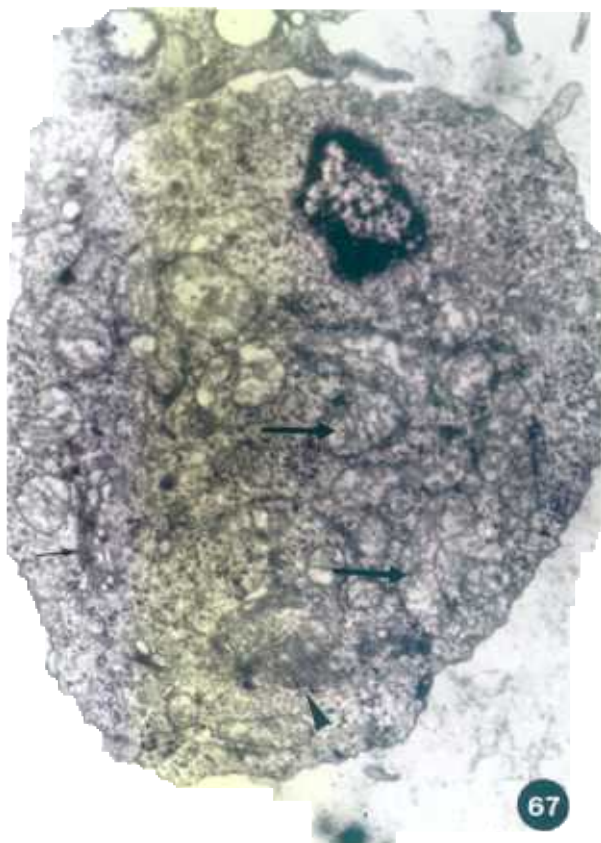
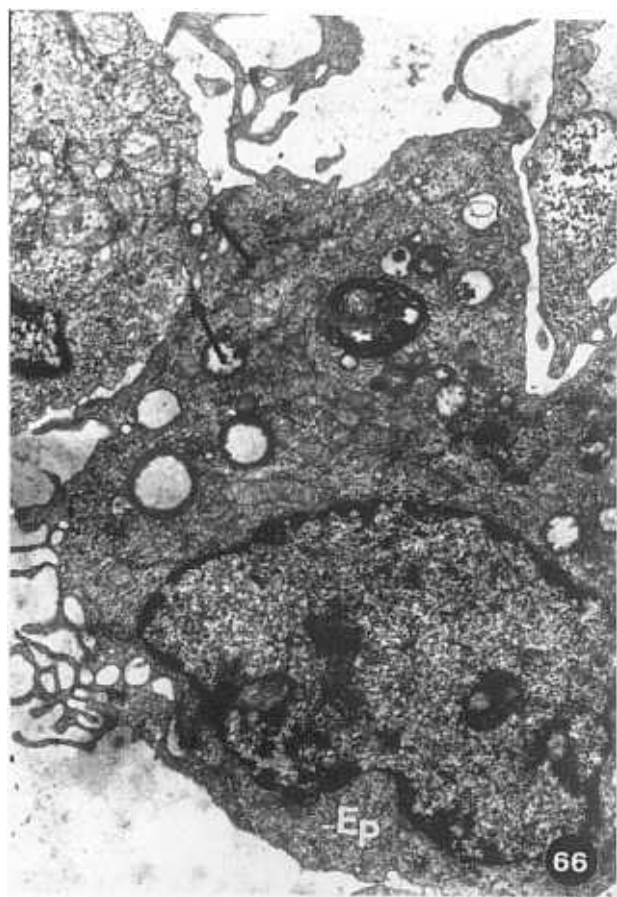
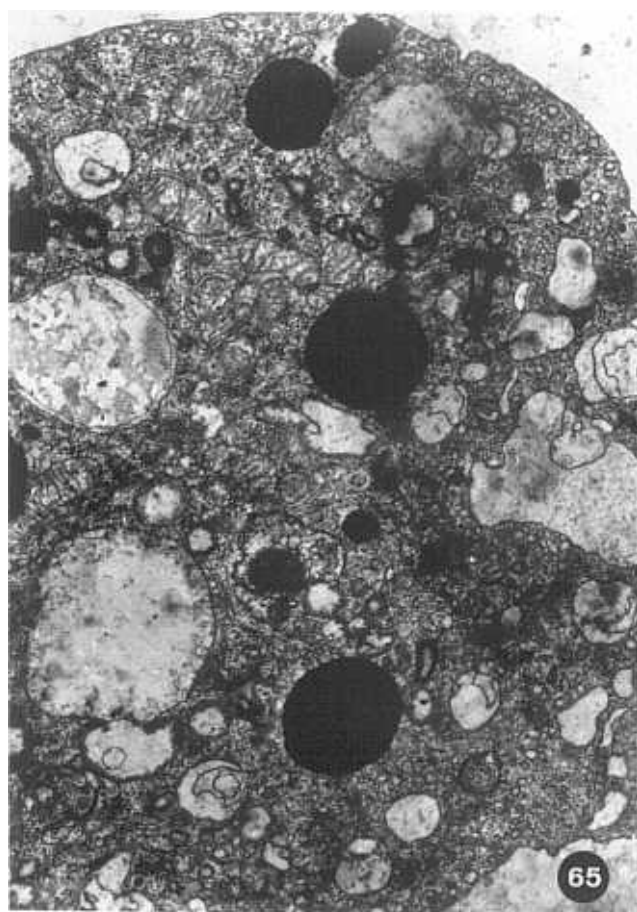
Figura 65. Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control. Célula fagocítica entre las capas epiteliales externas. x45.000.

Figura 66. Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control. Célula epitelial (Ep) estableciendo contactos en su superficie (→) con otras células epiteliales próximas, de aspecto primitivo. x38.000.

Figura 67. Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control. Las células epiteliales (Ep) primitivas tienen en los fragmentos numerosas mitocondrias (→), un aparato de Golgi bien desarrollado (→) y filamentos citoplásmicos (◄). x24.000.

Figura 68. Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo. Célula epitelial primitiva (Ep) en división en el borde del fragmento. x14.000.





**Figura 69.** Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control. En el interior del fragmento, junto con células fagocíticas (Fg) aparecen células epiteliales (Ep) y restos linfoides degenerados (→). x12.000.

**Figura 70.** Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo. Se observan abundantes restos linfoides degenerados (→) en el interior del fragmento. x24.000.

**Figura 71.** Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo. Masas de cromatina (cr) fusionadas provenientes de linfocitos degenerados en el interior de los fragmentos. x37.000.

**Figura 72.** Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control. Citoplasma de una célula epitelial del interior del fragmento con numerosas vesículas membranosas (►), gránulos de glucógeno (→) y gránulos de densidad electrónica variable (★). x25.000.



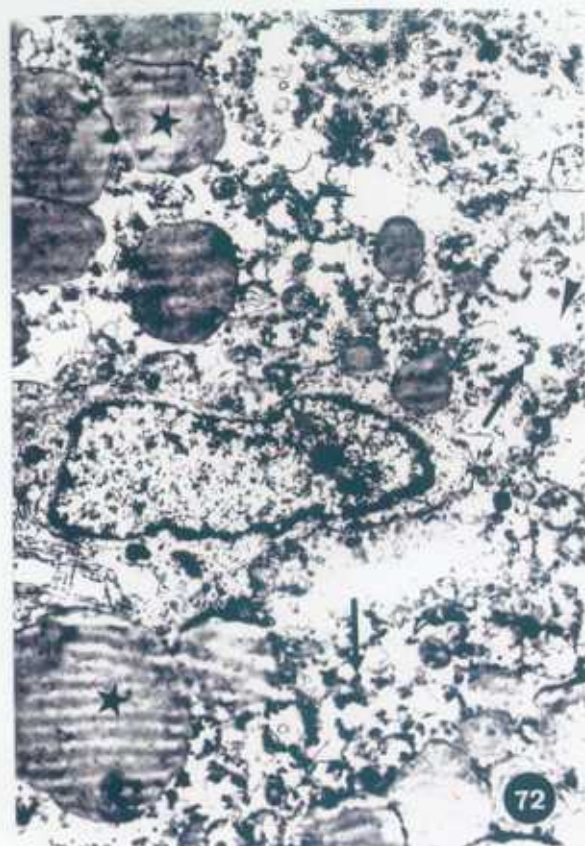
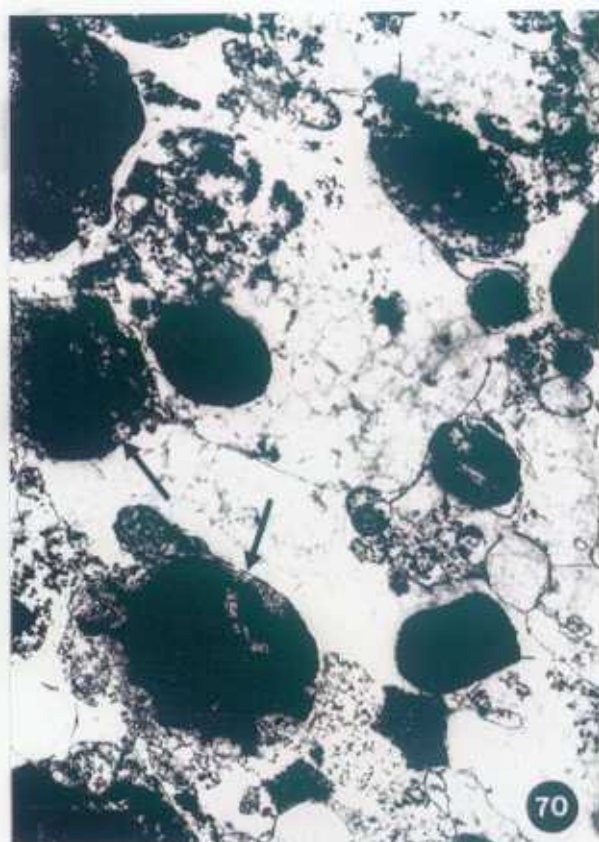
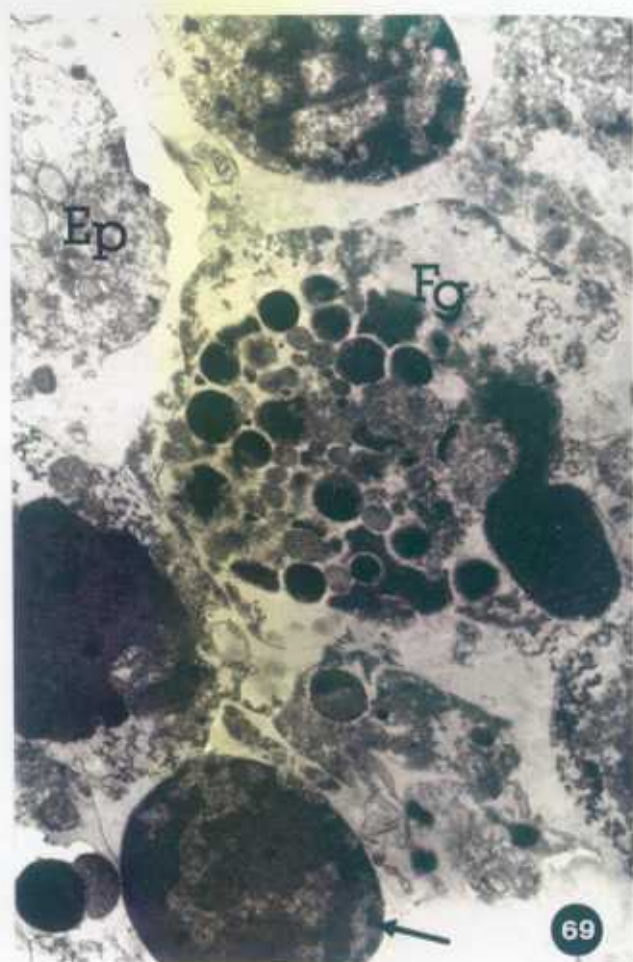


Figura 73. Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control. Célula epitelial no degenerada del interior del fragmento con cisternas de RER ( ◀ ) muy dilatadas, gránulos muy densos a los electrones ( ◀ ) y haces de tonofilamentos ( ← ). x25.000.

Figura 74. Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control. Citoplasma de una célula epitelial con gránulos densos a los electrones ( ◀ ) y tonofilamentos ( ◀ ). x45.000.

Figura 75. Fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control. Célula macrofágica en el interior del fragmento. x10.000.

Figura 76. Aspecto de un fragmento cultivado en suspensión tratado con dGuo 1,35mM durante 6 días. Se observa que, aunque hay grandes áreas con linfocitos picnóticos ( ◀ ), en otras zonas empiezan a distinguirse células epiteliales ( ← ). x200.



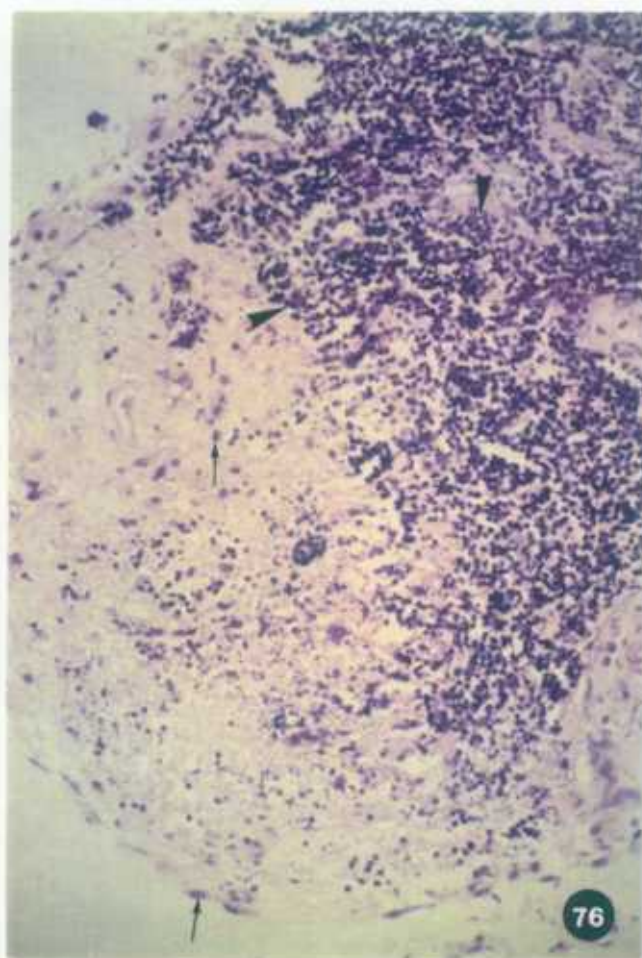
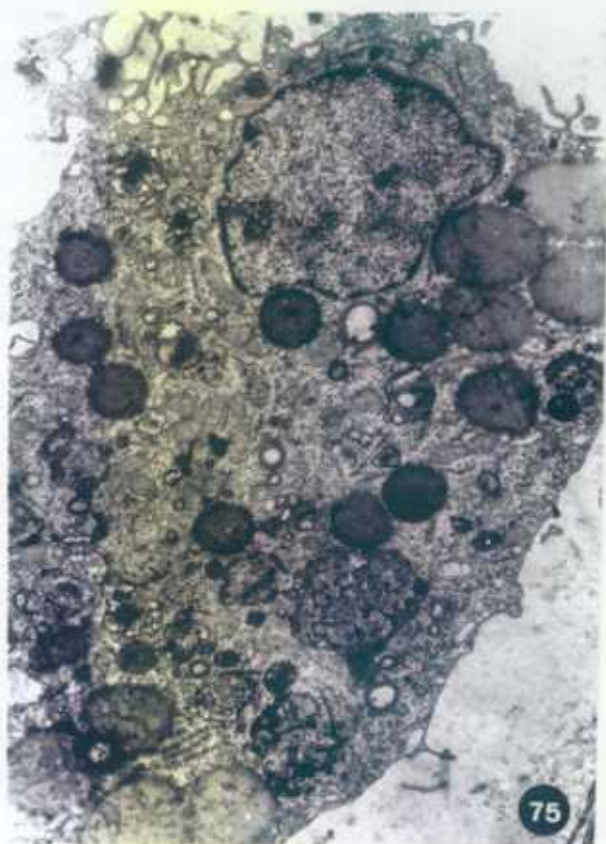
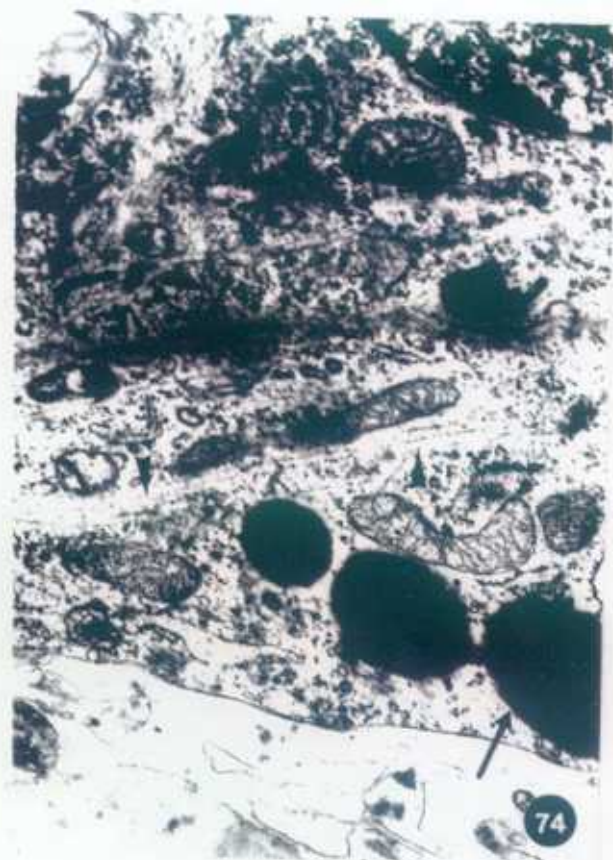


Figura 77. Fragmento cultivado en suspensión tratado con dGuo 1,35mM durante 6 días donde se aprecia una cierta diferenciación en zonas de corteza (C) y médula (M) con células epiteliales ( ↓ ) citoqueratina+. x80.

Figura 78. Fragmento cultivado en suspensión durante 8 días en medio control. Se distinguen numerosas células epiteliales ( → ) con un núcleo grande y redondeado situadas entre masas de colágeno ( ★ ). x80.

Figura 79. Fragmento cultivado en suspensión durante 8 días en medio control donde se aprecian células epiteliales ( →→ ) junto a masas de linfocitos necróticos ( ▲ ). x80.

Figura 80. Fragmento cultivado en suspensión tratado con dGuo 1,35mM durante 8 días. Junto a restos de pequeños linfocitos y células epiteliales alargadas ( ► ), se observa un quiste epitelial ( ★ ), entre las masas de colágeno ( →→ ), con abundante material celular descamado en su luz. x160.



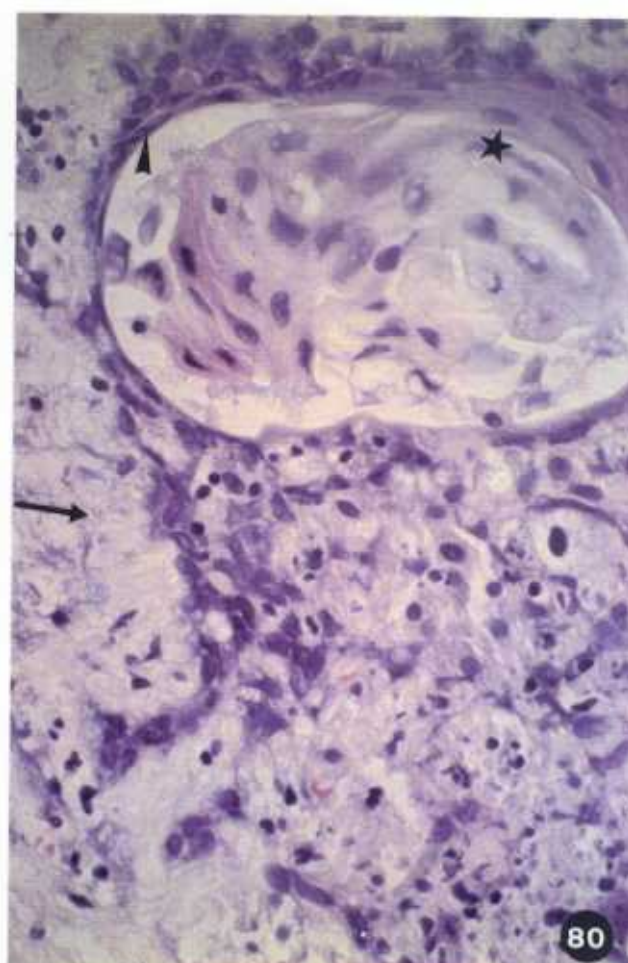
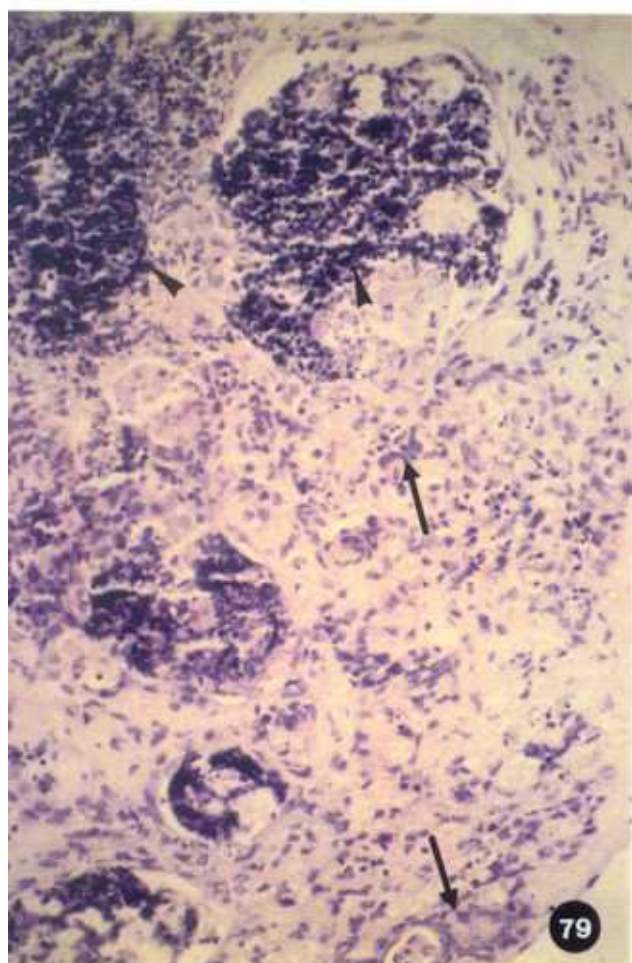
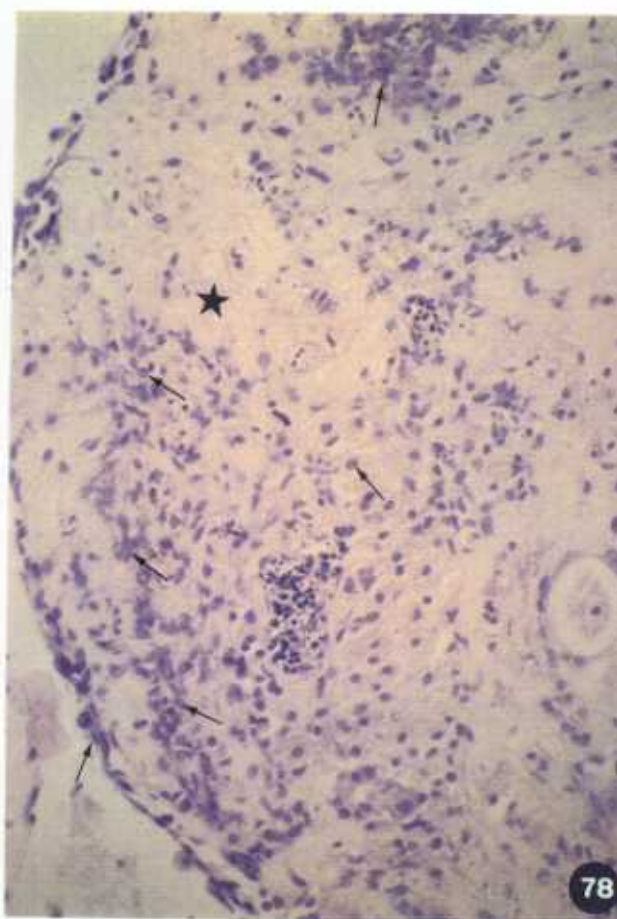
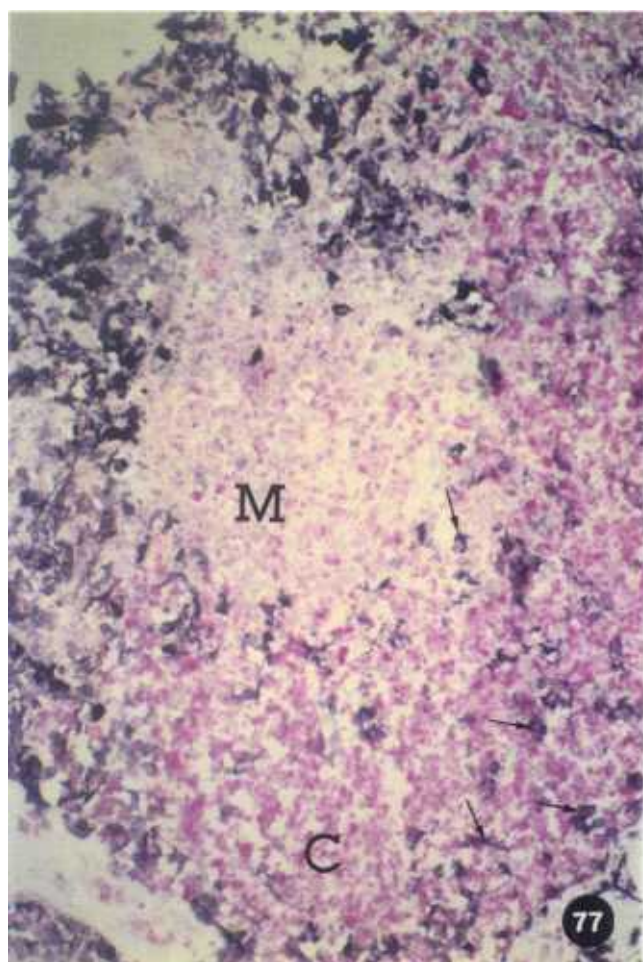


Figura 81. Fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con  $3,0\mu\text{g/ml}$  de CsA. Como en los fragmentos control, aparecen elementos epiteliales normales (  $\rightarrow$  ) junto a grandes masas de linfocitos degenerados (  $\blacktriangleright$  ). x80.

Figura 82. Fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con  $3,0\mu\text{g/ml}$  de CsA. Células epiteliales (  $\blacktriangleright$  ) que, con distintas morfologías, aparecen en el fragmento. x160.

Figura 83. Fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con  $10\mu\text{g/ml}$  de CsA. Notar que la mayoría de las células del fragmento aparecen picnóticas. x80.

Figura 84. Fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con  $50\mu\text{g/ml}$  de TBIO. Al igual que en los fragmentos tratados con  $10\mu\text{g/ml}$  de CsA, la mayoría de las células del fragmento presentan un aspecto picnótico. x40.



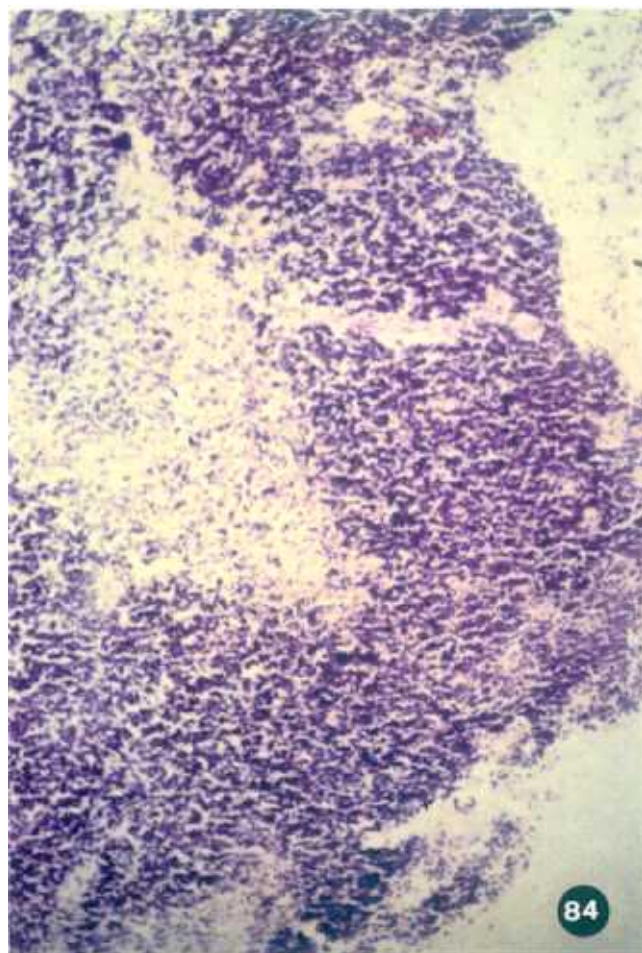
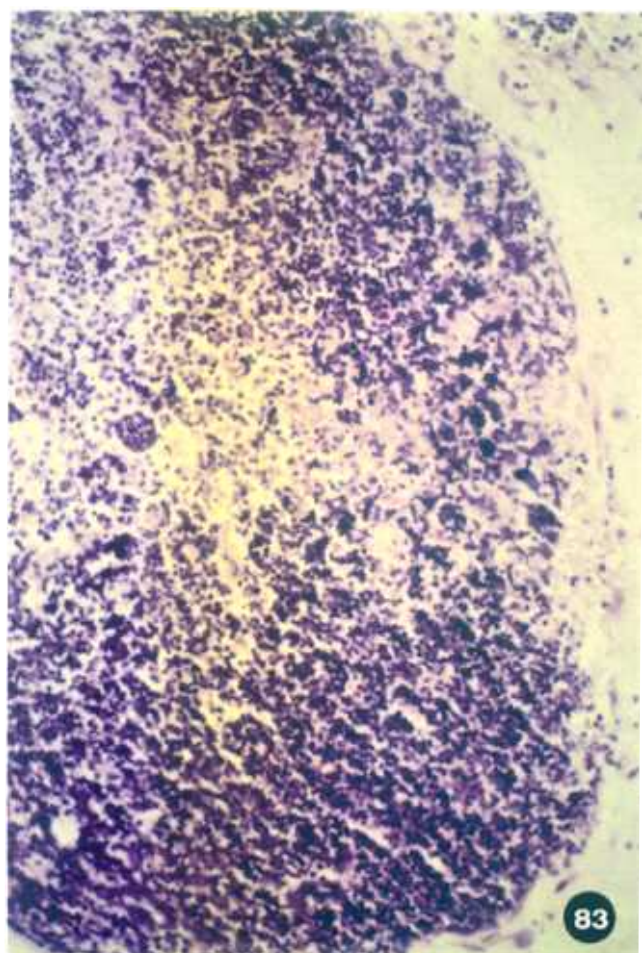
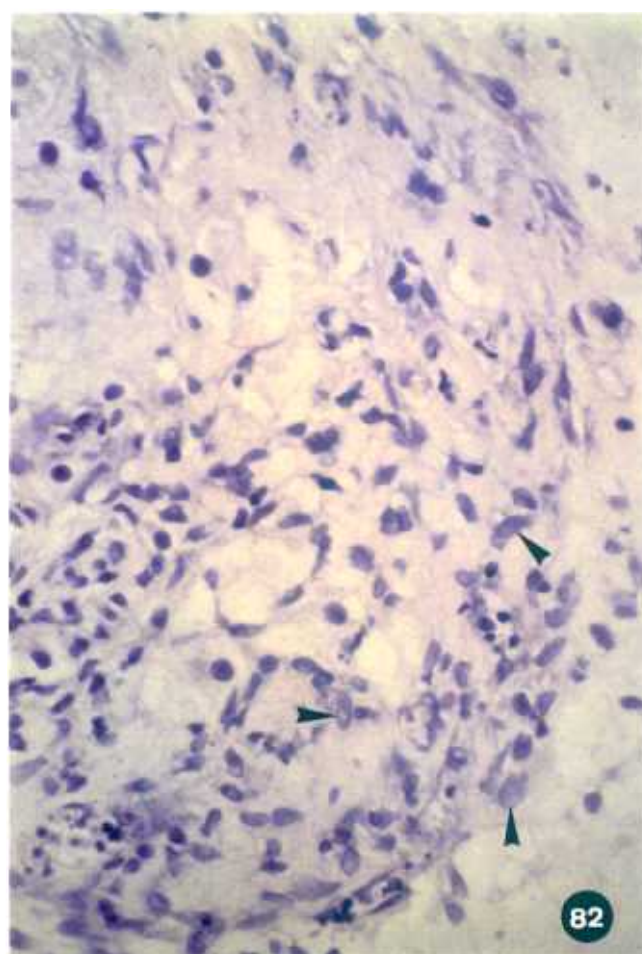
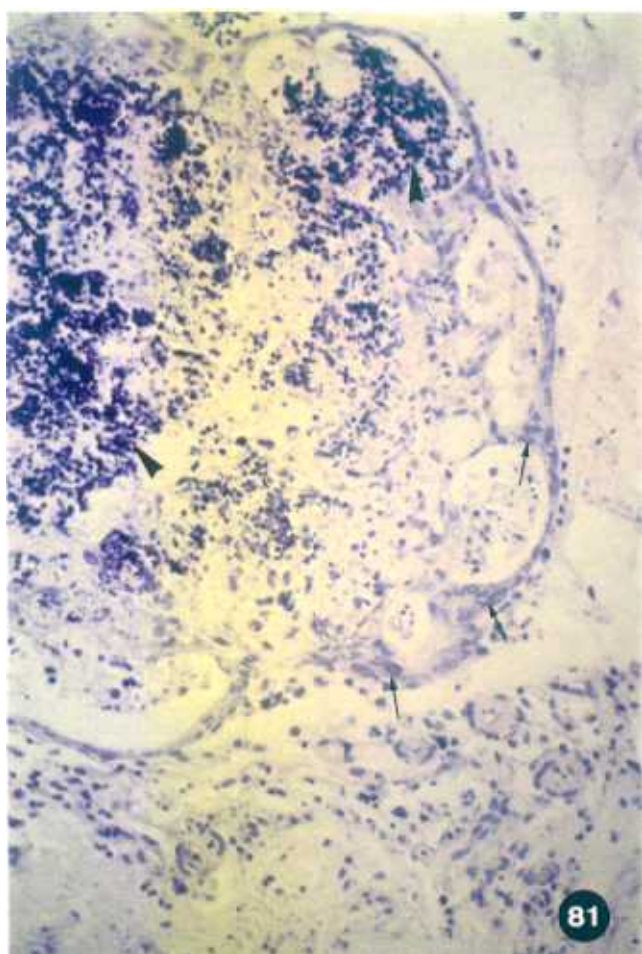


Figura 85. Células epiteliales citoqueratina+ ( ► ) situadas preferentemente en el borde de un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días en medio control. x200.

Figura 86. Células epiteliales citoqueratina+ ( ► ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM. Se observan en el borde pero también en el interior del fragmento con un patrón tanto reticular ( ↑ ) como en células de citoplasma grande ( ↑ ). x200.

Figura 87. Células epiteliales citoqueratina+ ( → ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml. x200.

Figura 88. Células epiteliales His-38+ ( → ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días en medio control. x200.



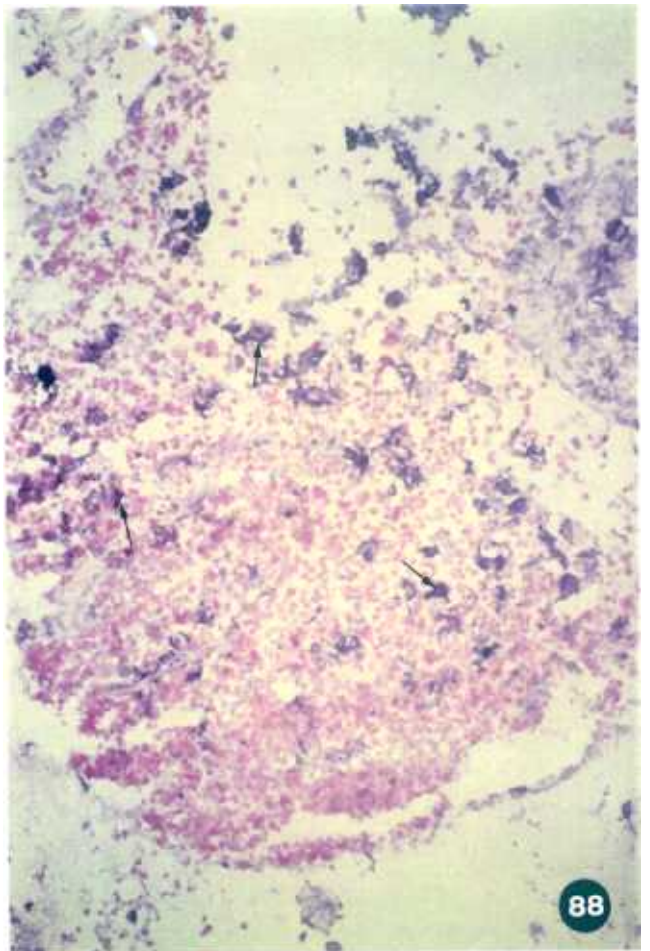
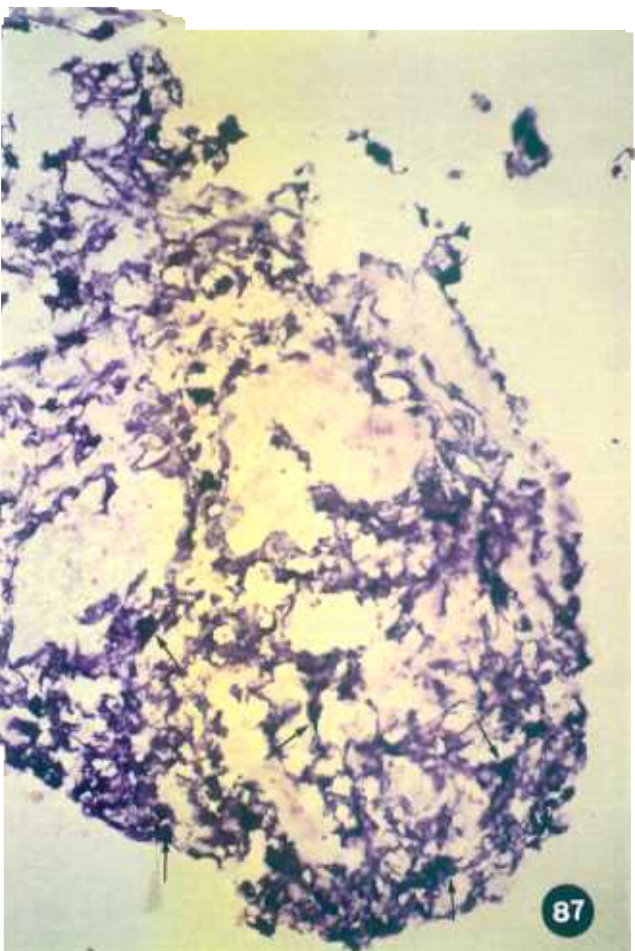
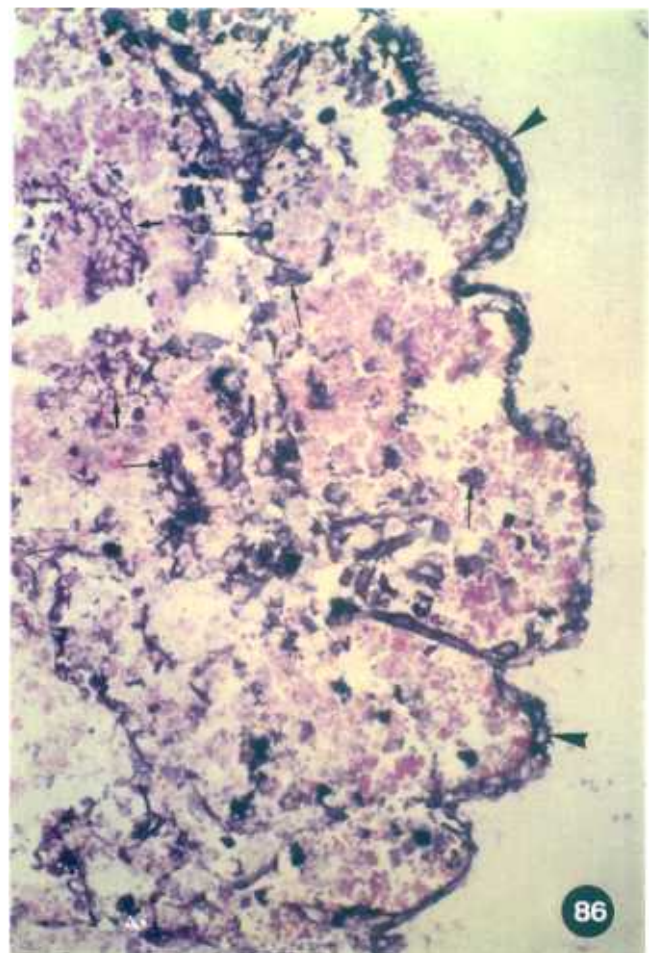
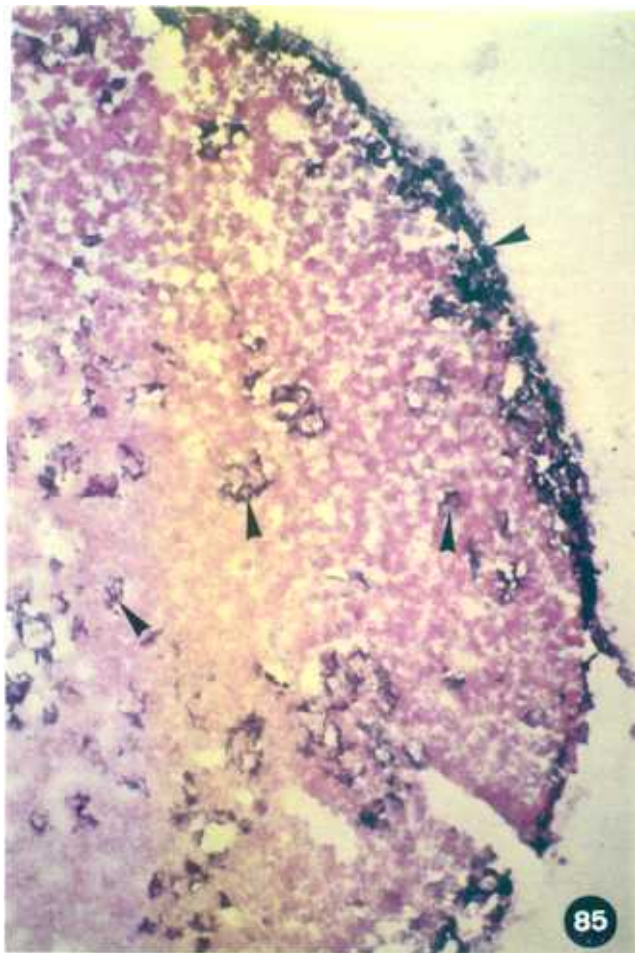


Figura 89. Células epiteliales His-38+ ( → ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM. x80.

Figura 90. Células epiteliales His-38+ ( → ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0μ/ml. x200.

Figura 91. Células epiteliales His-39+ ( ← ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días en medio control. x80.

Figura 92. Células epiteliales His-39+ ( ← ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM. x200.



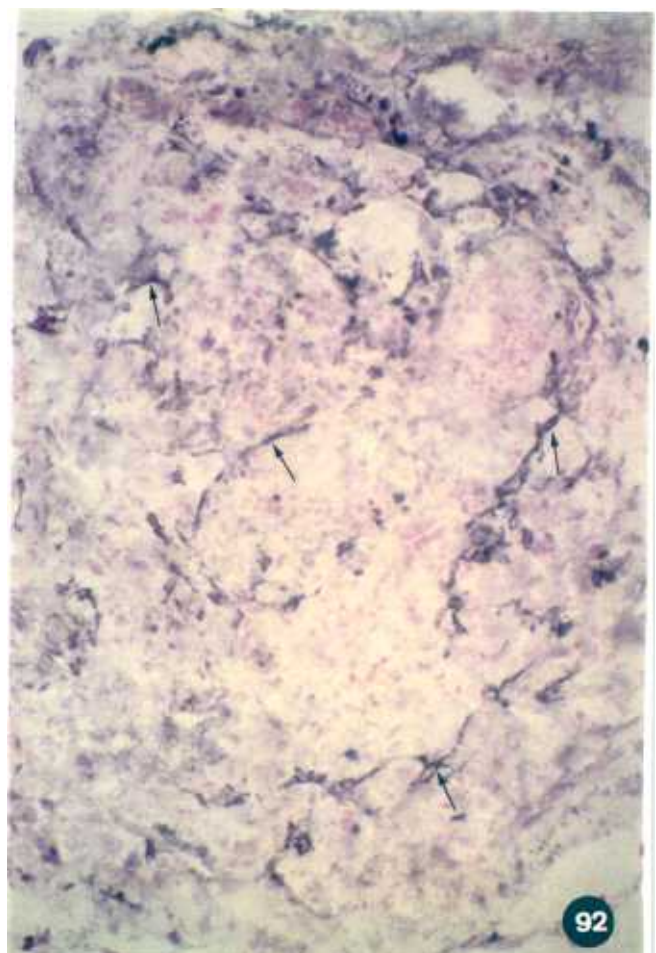
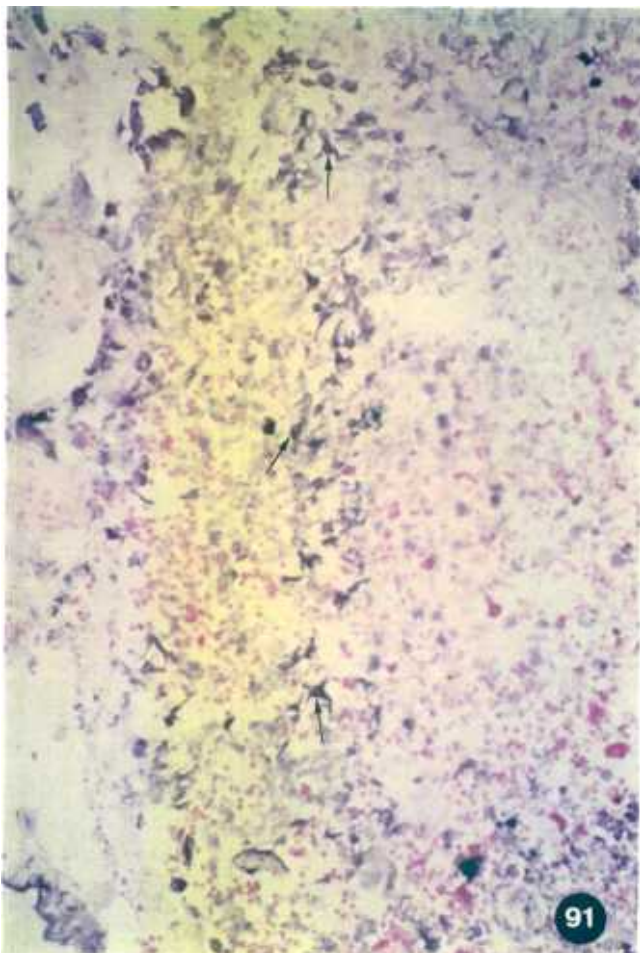
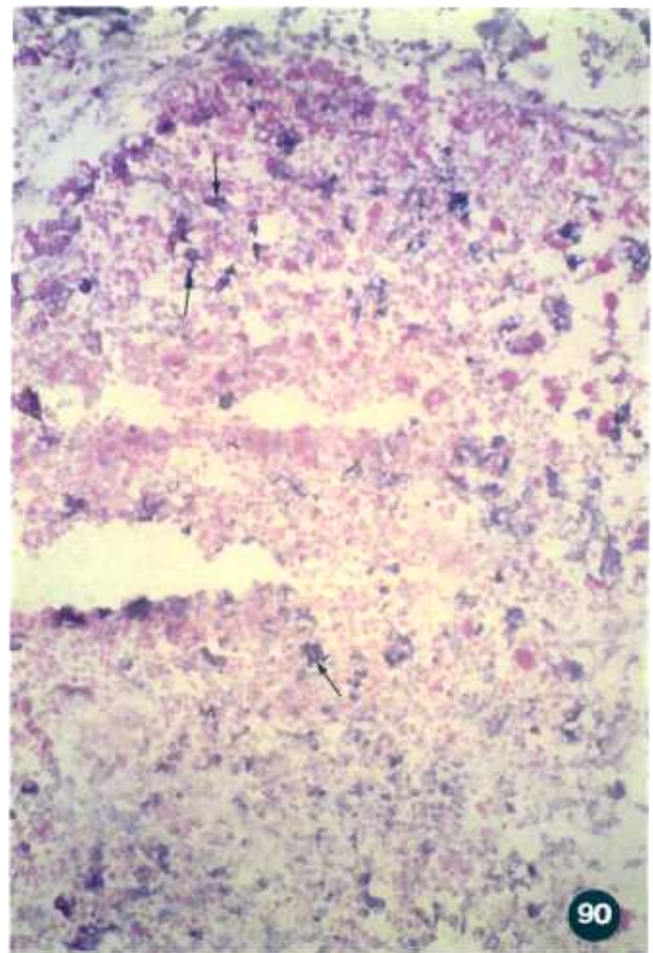
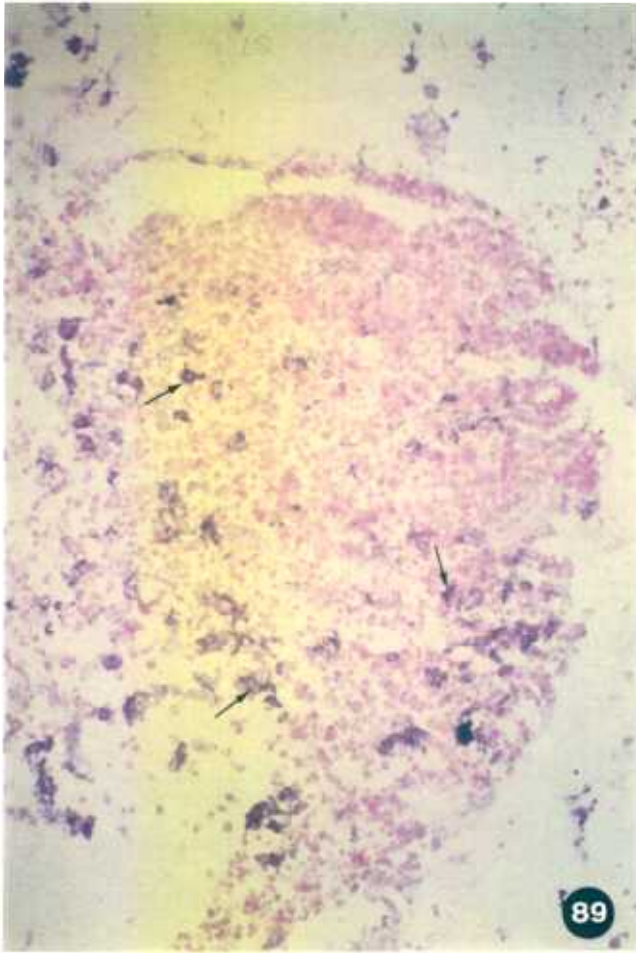


Figura 93. Células epiteliales His-39+ ( ← ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0 $\mu$ g/ml. x200.

Figura 94. Macrófagos ED1+ ( → ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días en medio control. x200.

Figura 95. Macrófagos ED1+ ( ← ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM. x200.

Figura 96. Macrófagos ED1+ ( ← ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0 $\mu$ g/ml. x200.



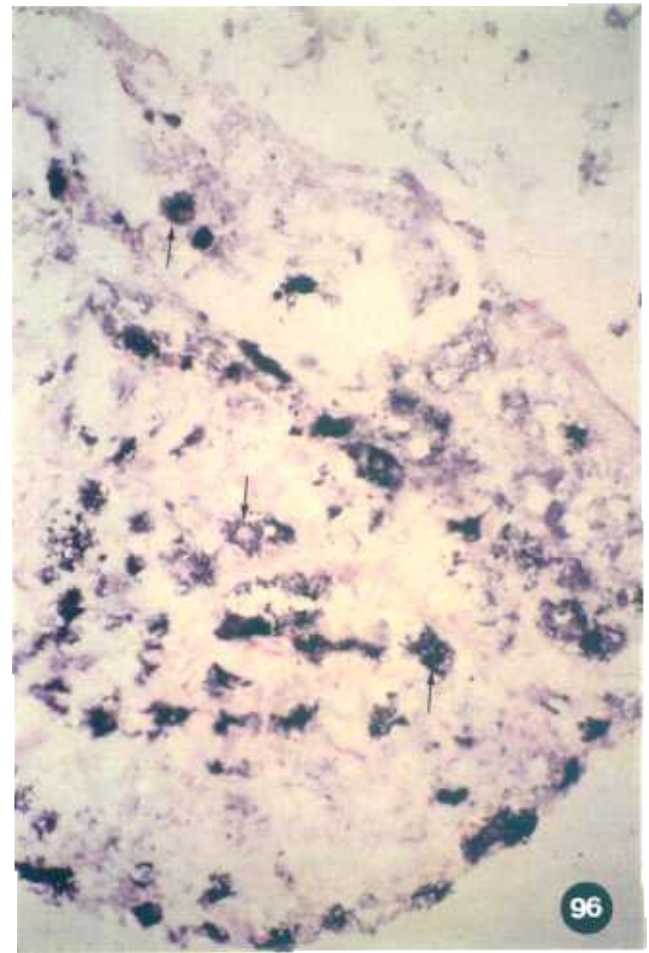
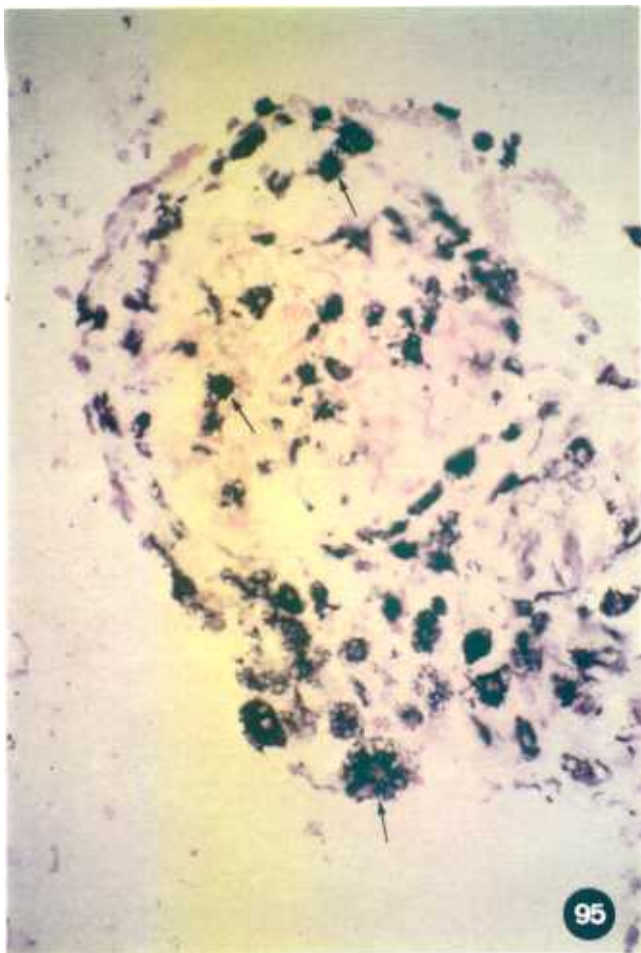
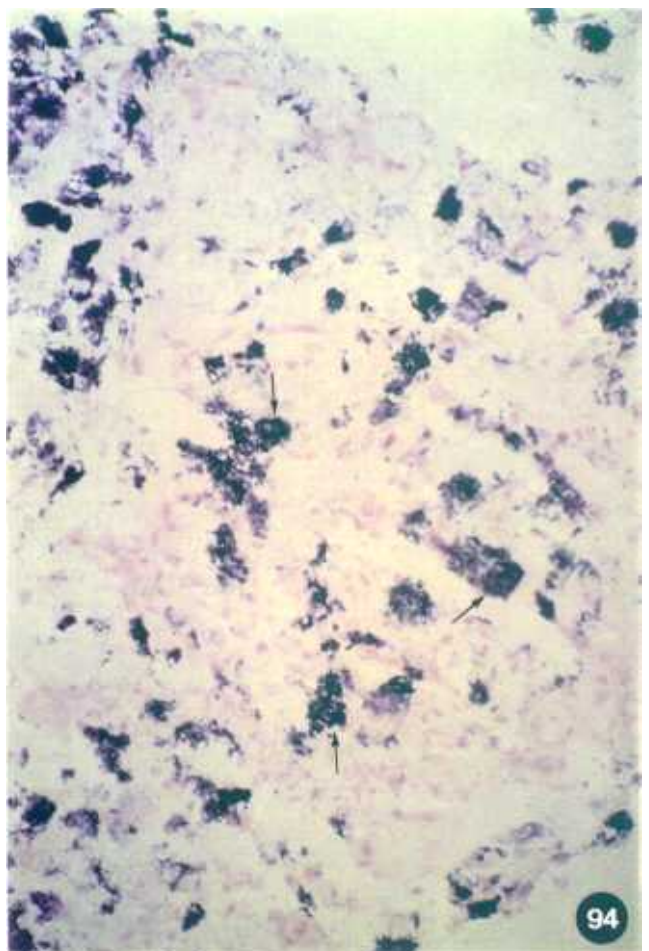
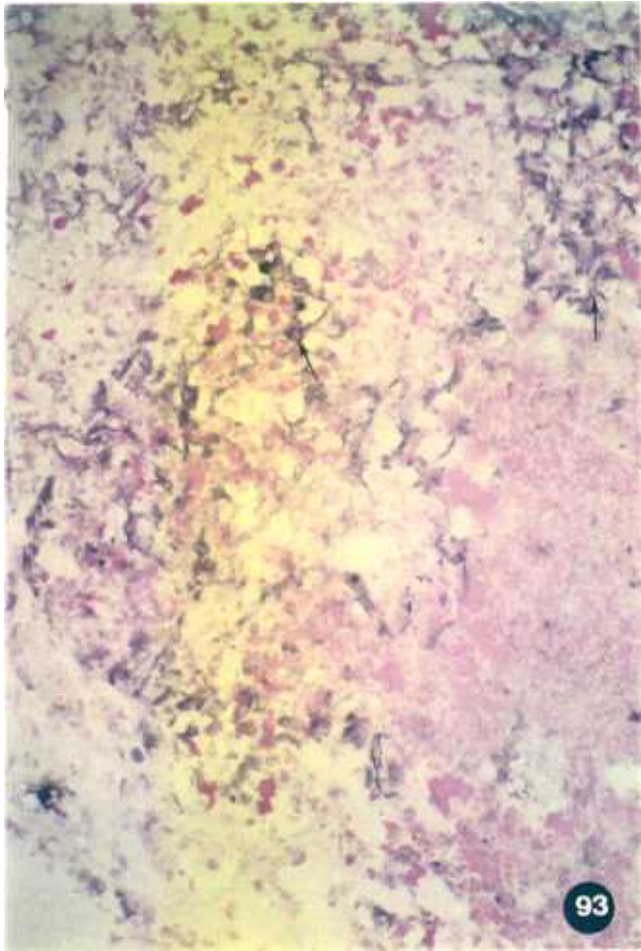


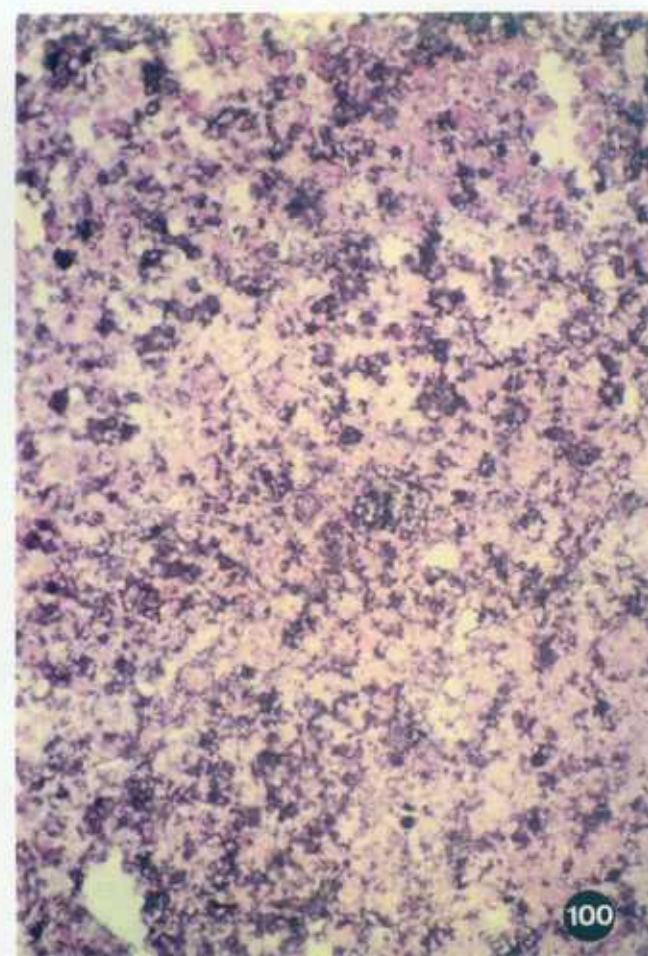
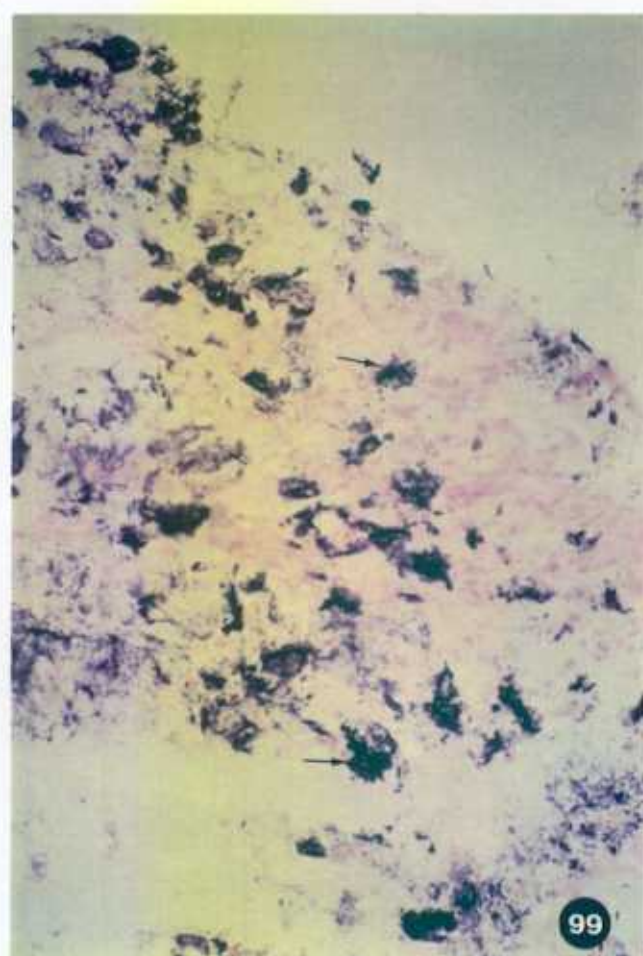
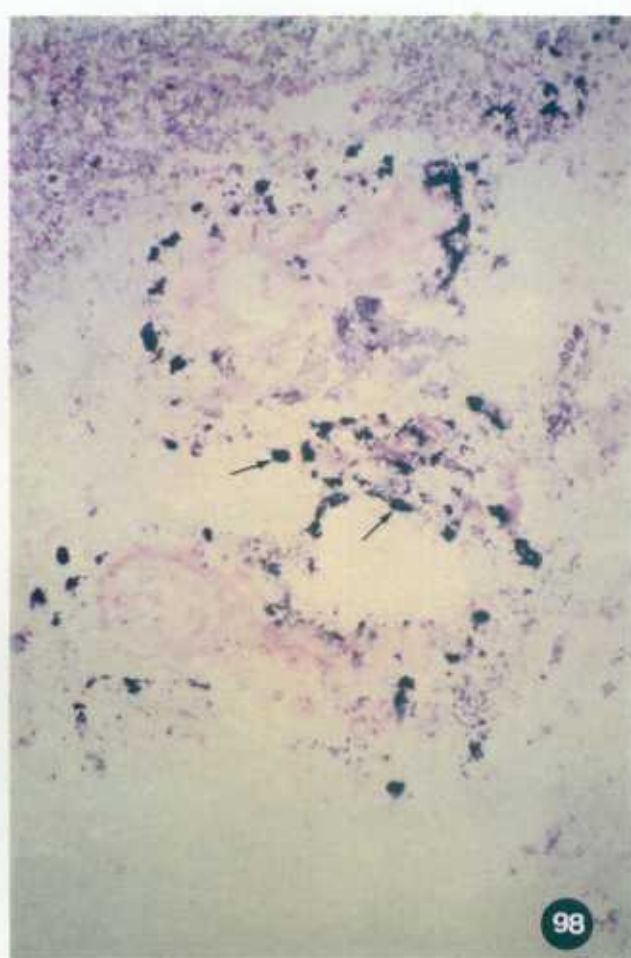
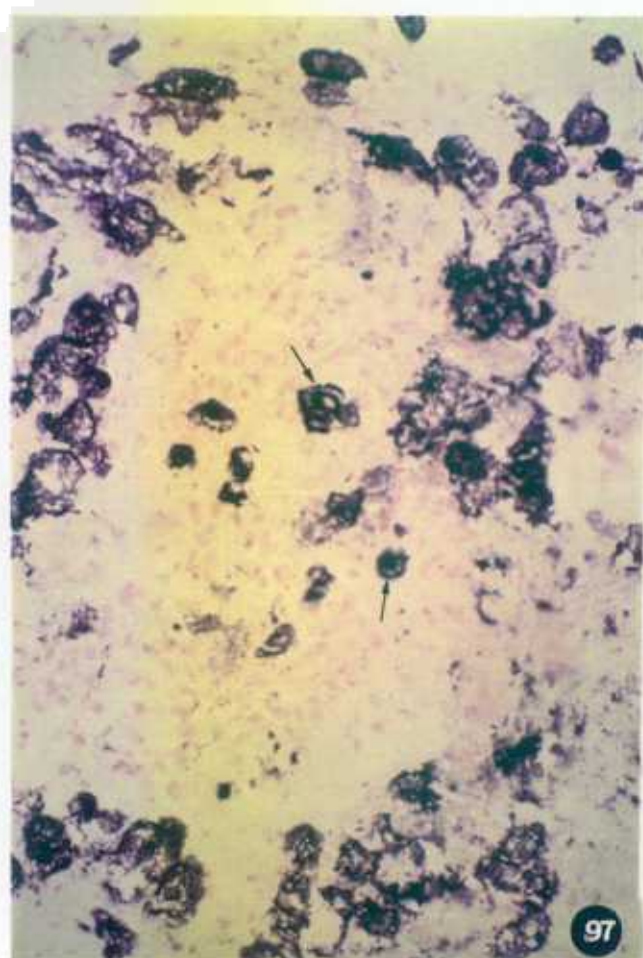
Figura 97. Macrófagos ED2+ ( → ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días en medio control. x200.

Figura 98. Macrófagos ED2+ ( → ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM. x80.

Figura 99. Macrófagos ED2+ ( → ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml. x200.

Figura 100. Expresión de moléculas del MHC de clase I (OX-18+) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días en medio control. x80.





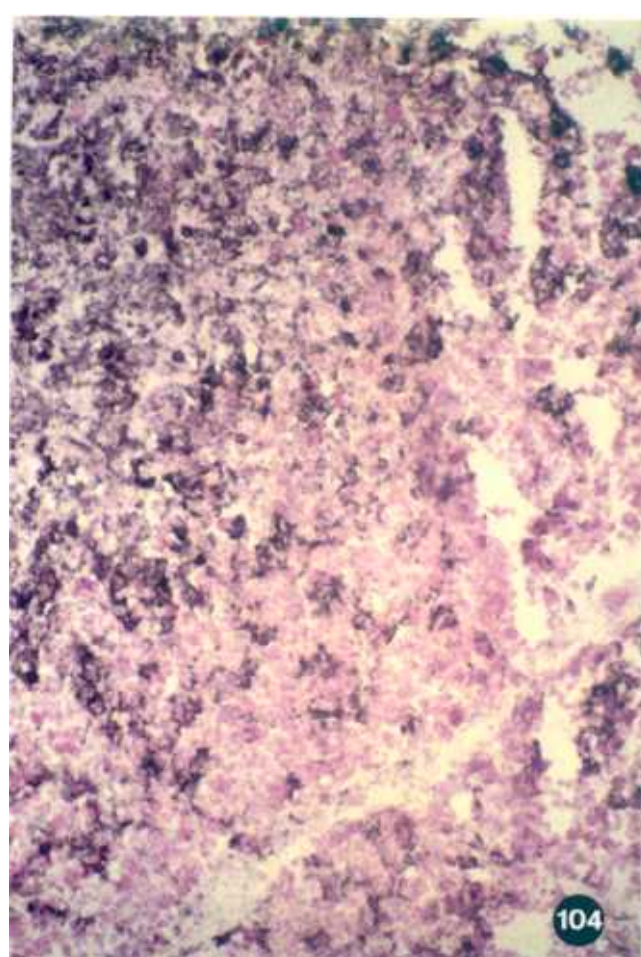
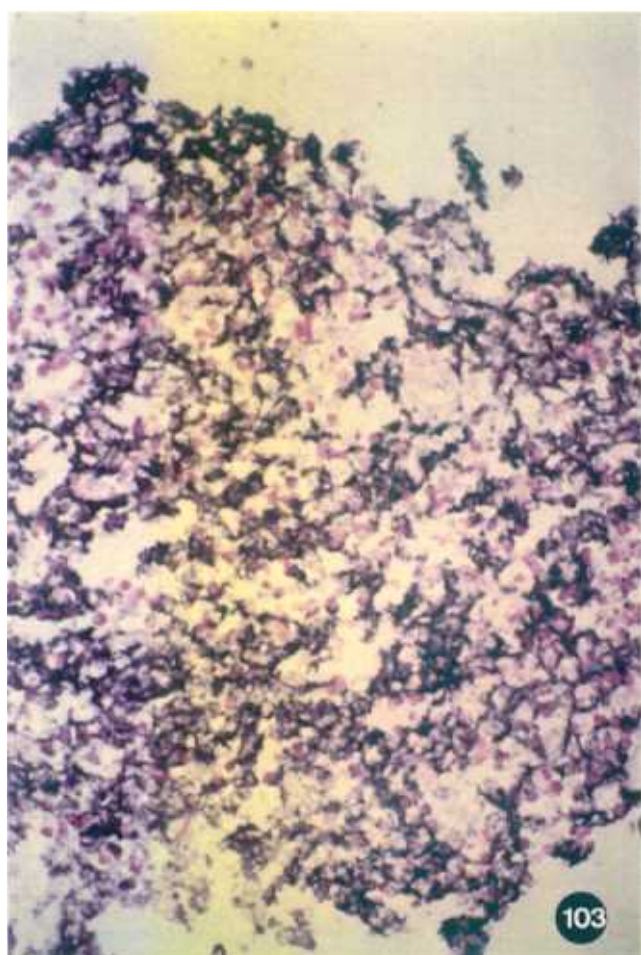
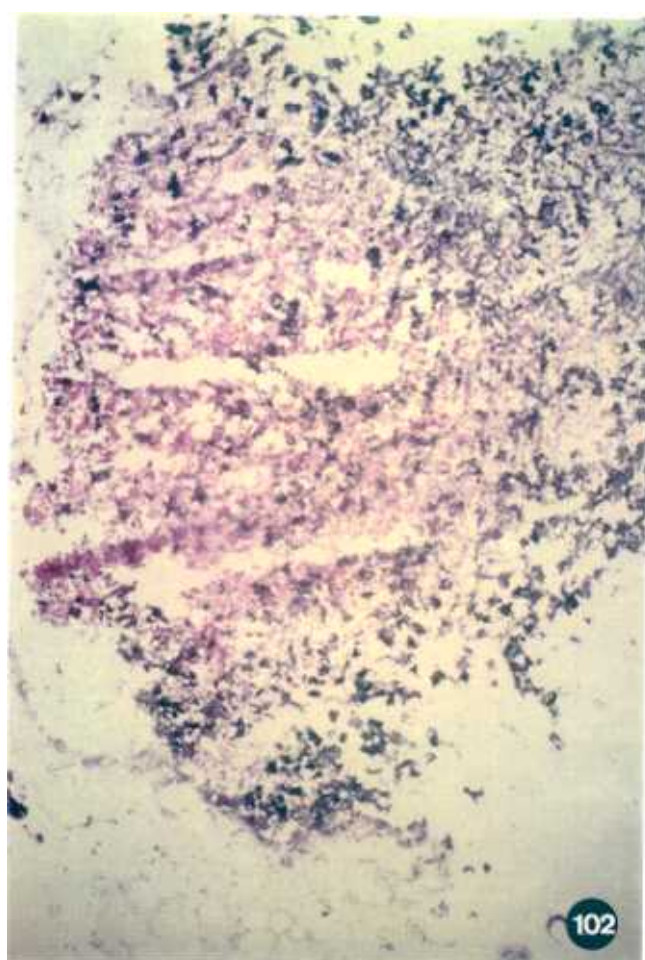
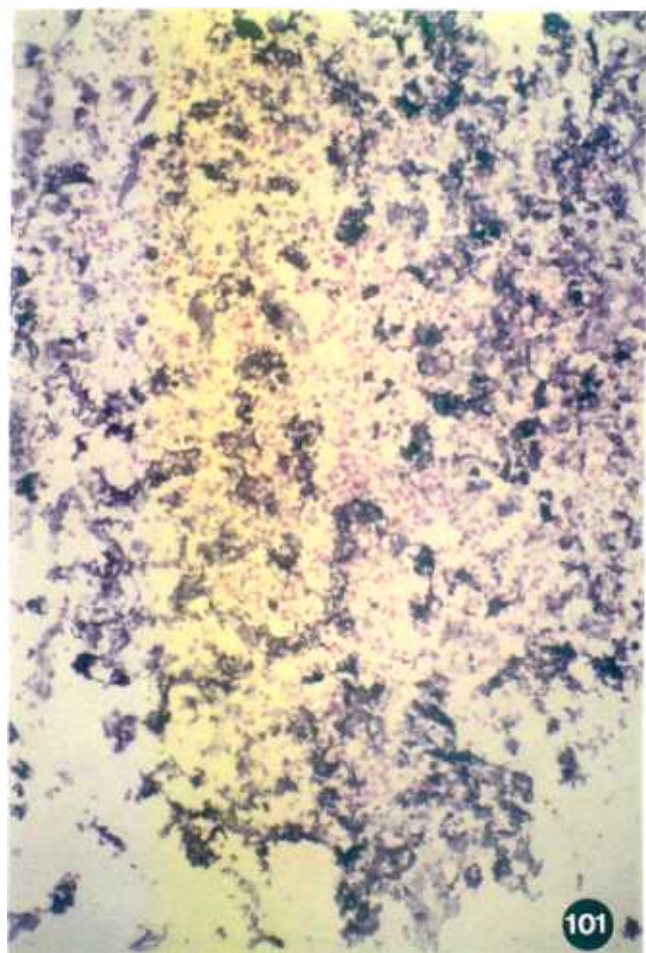
**Figura 101.** Expresión de moléculas del MHC de clase I (OX-18+) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM. x80.

**Figura 102.** Expresión de moléculas del MHC de clase I (OX-18+) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml. x40.

**Figura 103.** Expresión de moléculas del MHC de clase II (células ER-13+) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días en medio control. x80.

**Figura 104.** Expresión de moléculas del MHC de clase II (ER-13+) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM. x80.





**Figura 105.** Expresión de moléculas del MHC de clase II (ER-13+) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml. x80.

**Figura 106.** Fragmento de timo de ratón no cultivado trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar, 4 días después del trasplante. El tejido está constituido por fibroblastos (▲) entre masas de colágeno y se encuentra infiltrado por células de aspecto linfóide (→). En ningún momento la organización del trasplante recordó histológicamente a un timo. R, túbulos renales. x200.

**Figura 107.** Fragmento de timo de ratón cultivado adherido al soporte del cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar, 4 días después del trasplante. Como en el caso de trasplantes de timos sin cultivar la organización del trasplante consiste predominantemente de tejido conectivo que, en este caso, muestra un mayor desarrollo. Nótese la importante infiltración linfóide en el fragmento trasplantado. x100.

**Figura 108.** Fragmento de timo de ratón cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata AO, 28 días después del trasplante. El tejido trasplantado se ha reducido considerablemente de tamaño y consiste únicamente de un infiltrado linfóide (→) entre los restos de tejido conectivo. R, túbulos renales. x200.



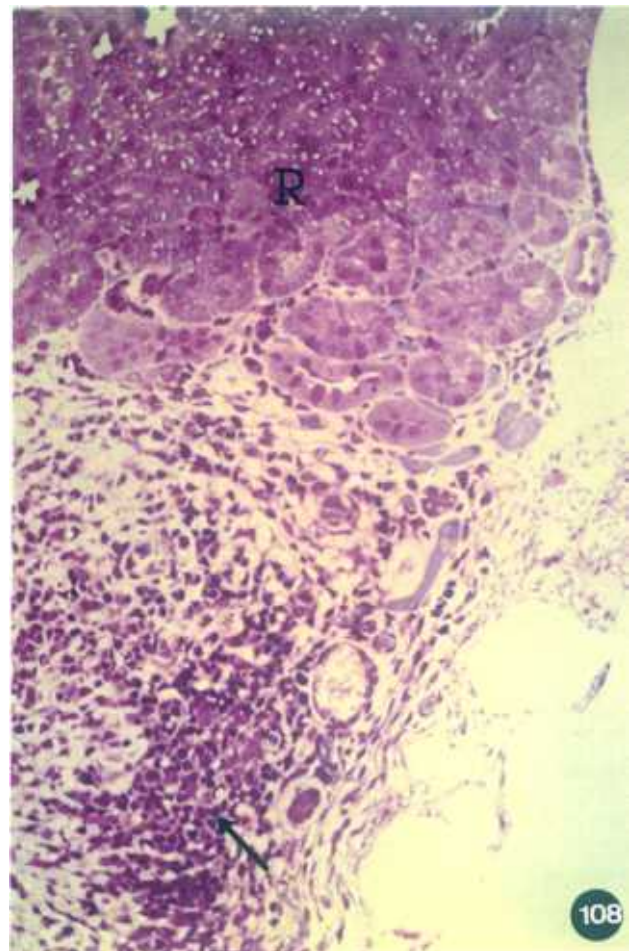
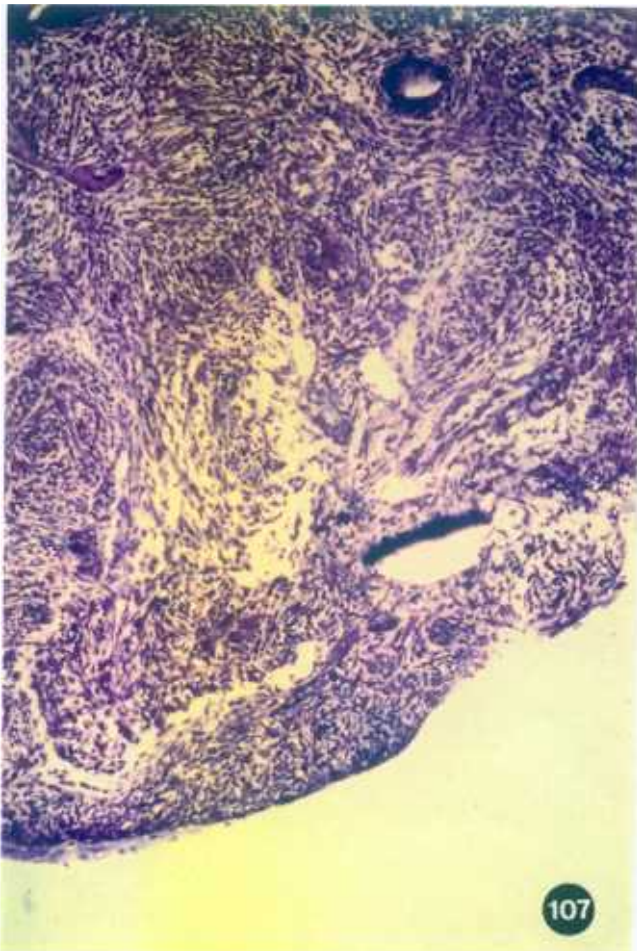
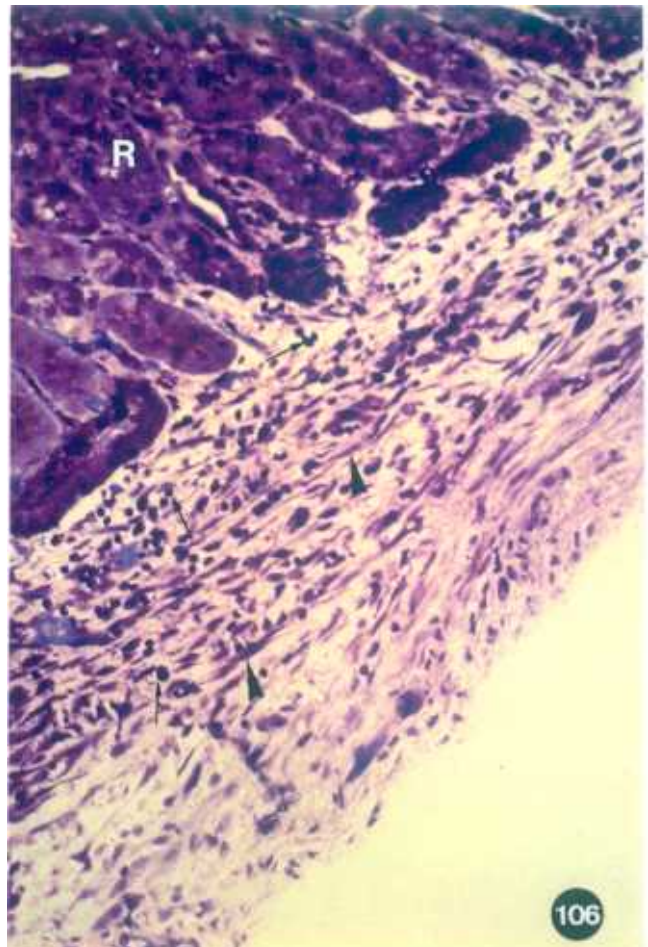
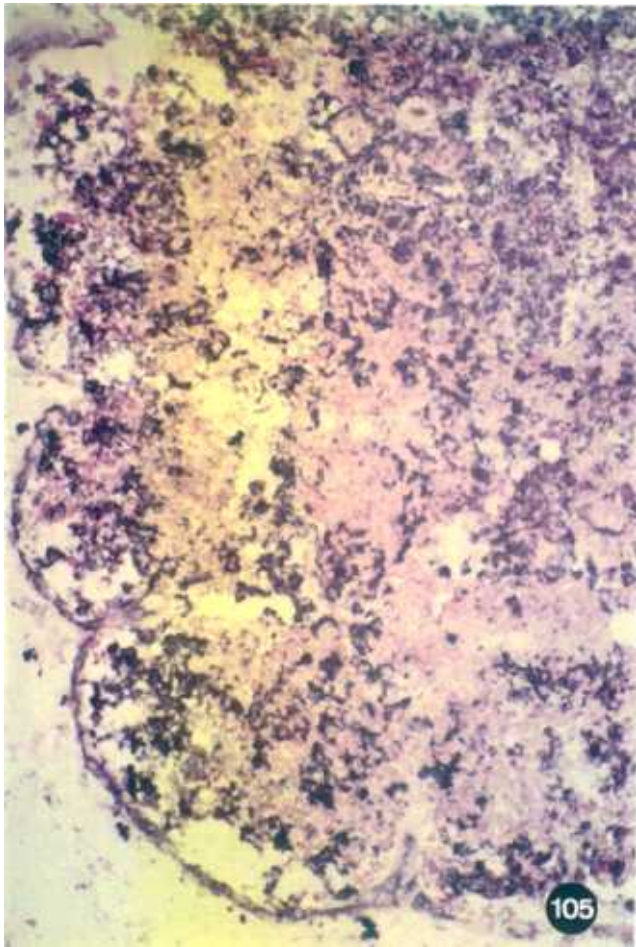


Figura 109. Fragmento de timo de rata no cultivado trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 4 días después del trasplante. Como en casos anteriores el fragmento trasplantado consiste principalmente de tejido conectivo con algunos vasos sanguíneos y un infiltrado linfoide. No obstante, en algunas regiones del trasplante se observaban células epiteliales aplanadas muy empaquetadas (→). x200.

Figura 110. Fragmento de timo de rata cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 2 días después del trasplante. En el borde entre trasplante y riñón (★) se empieza a reorganizar un tejido epitelial infiltrado de células de aspecto linfoide. También se observaban células de aspecto monocítico (●) así como masas de colágeno (→). R, túbulo renal. x200.

Figura 111. Fragmento de timo de rata cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días tratado con dGuo 1,35mM, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 2 días después del trasplante. El desarrollo del fragmento trasplantado es menor que en el caso de los fragmentos control de manera que entre las células epiteliales (►) pueden observarse huecos (★) donde todavía no se ha dado la reorganización del estroma epitelial. x200.

Figura 112. Fragmento de timo de rata cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 2 días después del trasplante. Notar la existencia de una capa de tejido conectivo laxo con numerosos fibroblastos (→), células de aspecto monocítico (→), fibras de colágeno (★) y vasos sanguíneos (►) entre el límite epitelial del trasplante (■) y el área de tejido compacto próximo al tejido renal. x200.



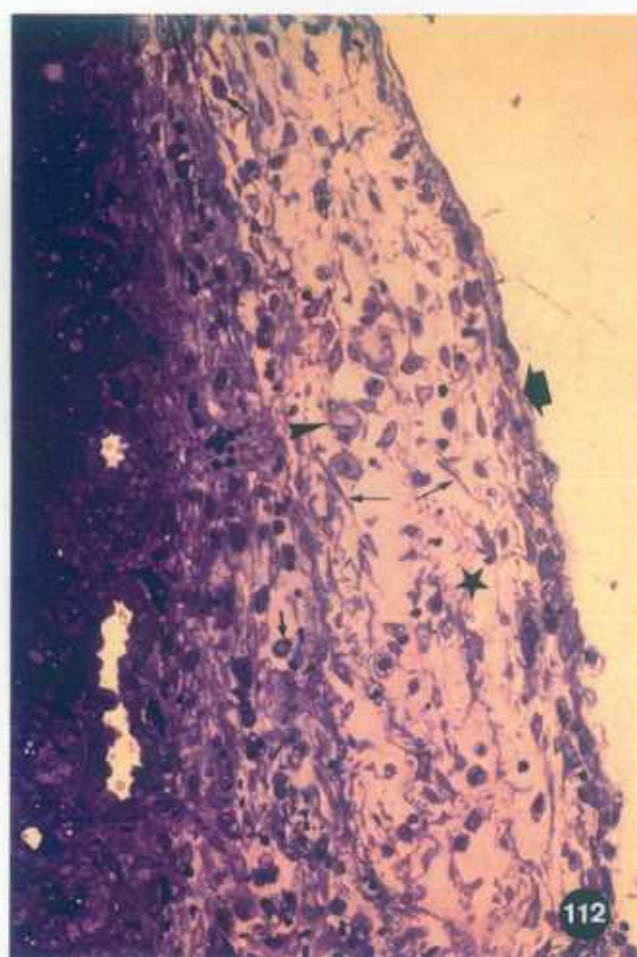
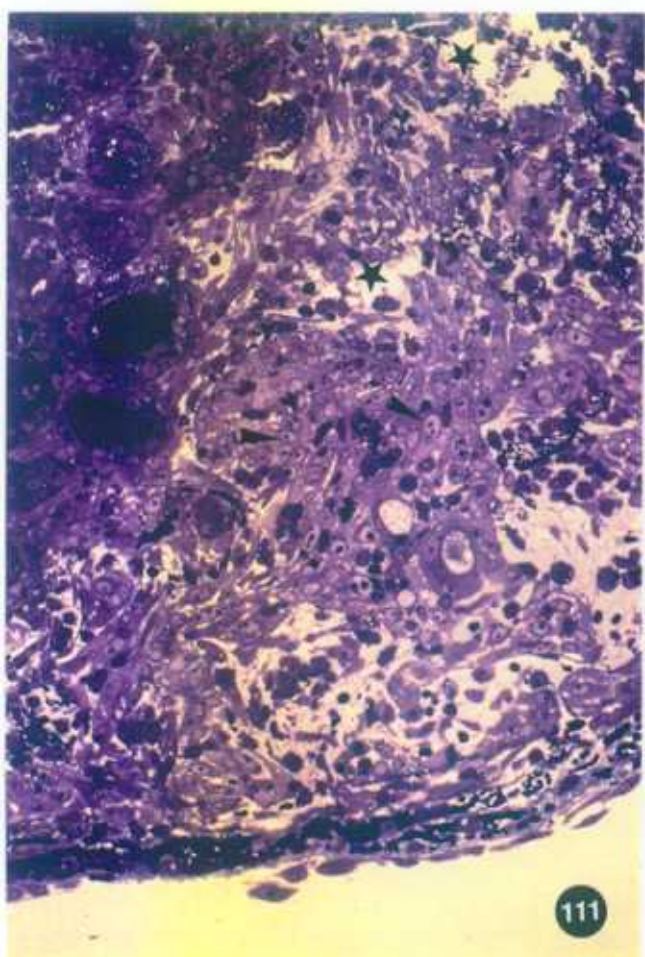
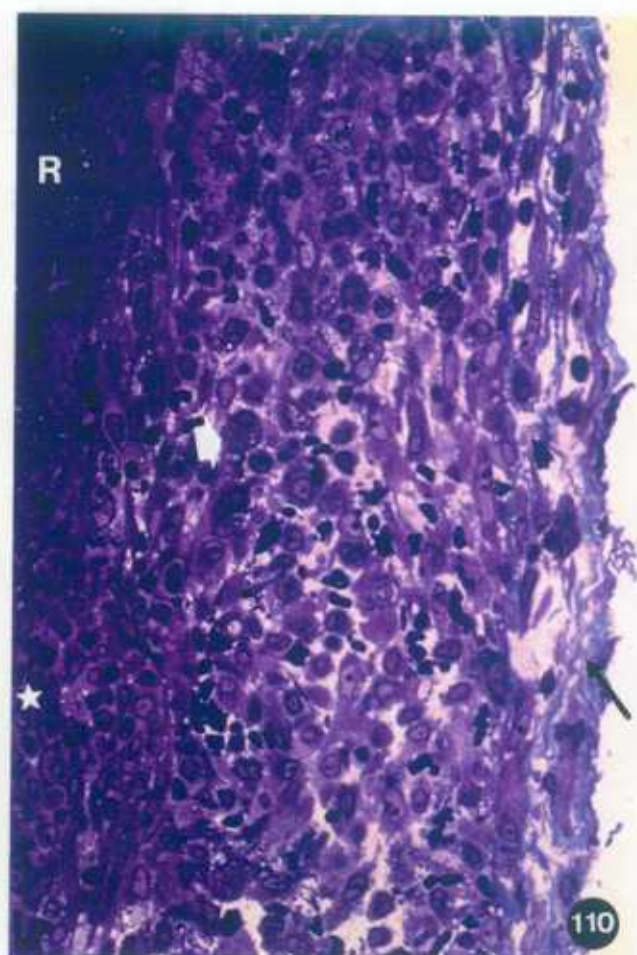
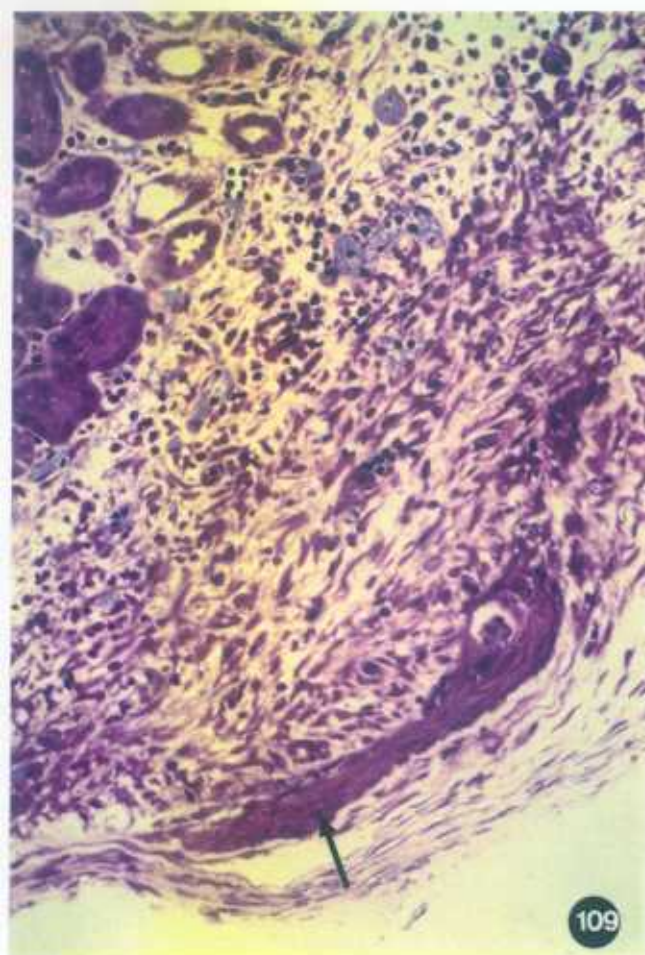


Figura 113. Fragmento de timo de rata cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 5 días después del trasplante. El fragmento ha aumentado de tamaño y se distinguen claramente tres regiones: una exterior con un predominio de células epiteliales aplanadas formando varias capas ( $\longrightarrow$ ), una intermedia conectiva ( $\star$ ) donde ha aumentado considerablemente el número de células de aspecto monocito-macrofágico ( $\blacktriangleright$ ), y una interna formada por un tejido linfoide y células de aspecto epitelial formando masas compactas que recuerdan al tejido tímico ( $\star$ ). x200.

Figura 114. Fragmento de timo de rata cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días tratado con dGuo 1,35mM, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 5 días después del trasplante. No hay diferencia significativas con la histología exhibida por los fragmentos control y pueden identificarse una zona con elementos epiteliales aplanados ( $\longrightarrow$ ), una intermedia, menos desarrollada en este caso, con predominio de tejido conectivo ( $\star$ ) y una zona interna compacta de tejido linfoide en un estroma epitelial ( $\star$ ). x200.

Figura 115. Detalle de la organización de las capas externa y media de un fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, 5 días después de trasplante en condición alogénica. Notar las capas de células epiteliales aplanadas ( $\longrightarrow$ ) que constituyen el borde externo del trasplante y la zona intermedia de conectivo donde destaca la formación de vasos sanguíneos ( $\blacktriangleright$ ). x200.

Figura 116. Detalle de la organización de las capas externa y media de un fragmento cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en dGuo 1,35mM, 5 días después de trasplante en condición alogénica. La zona intermedia aparece, en este caso, más desarrollada ( $\star$ ) que en el caso de las Figs. 114 y 115. x200.



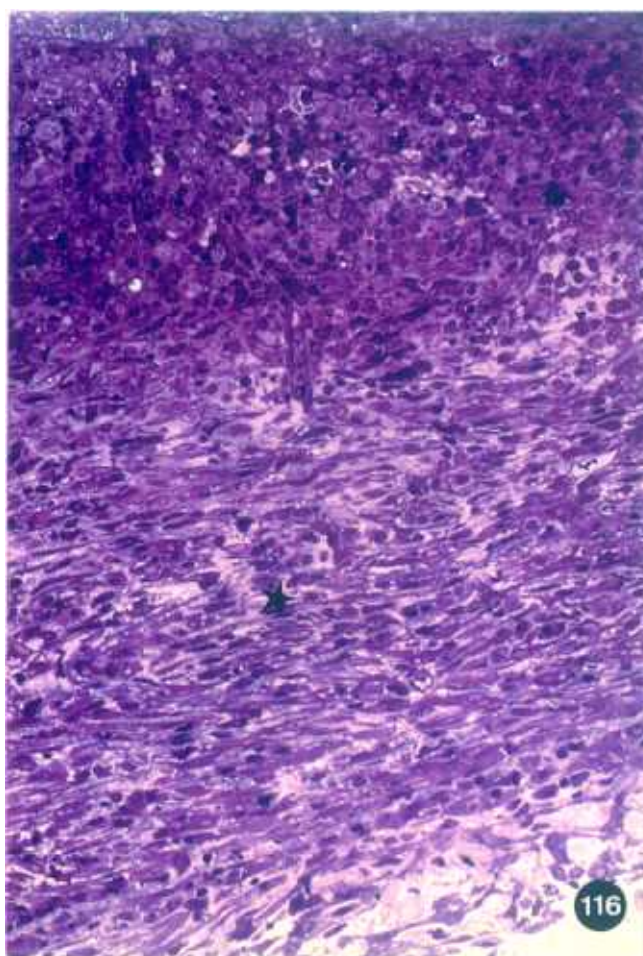
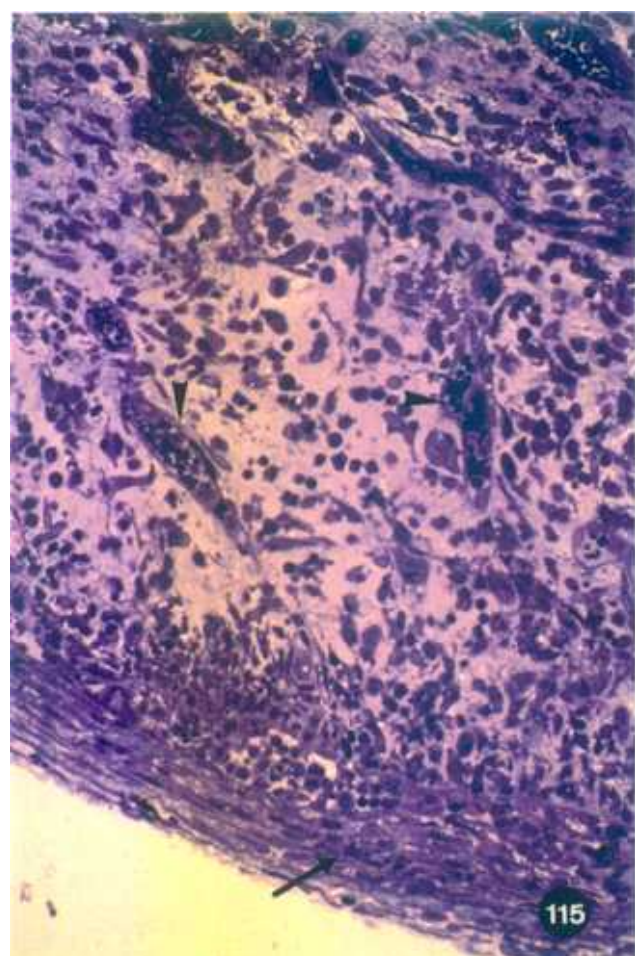
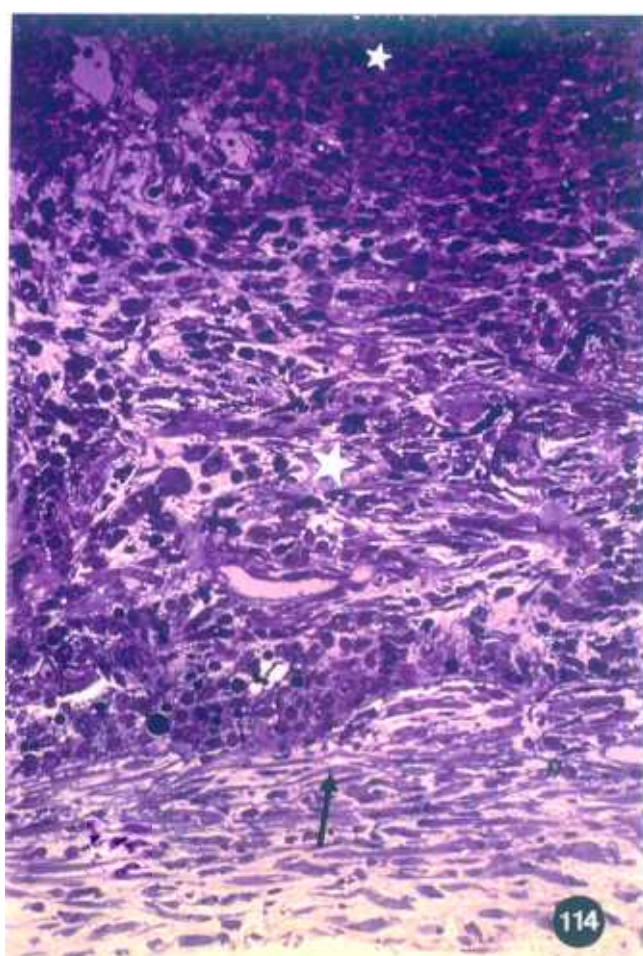
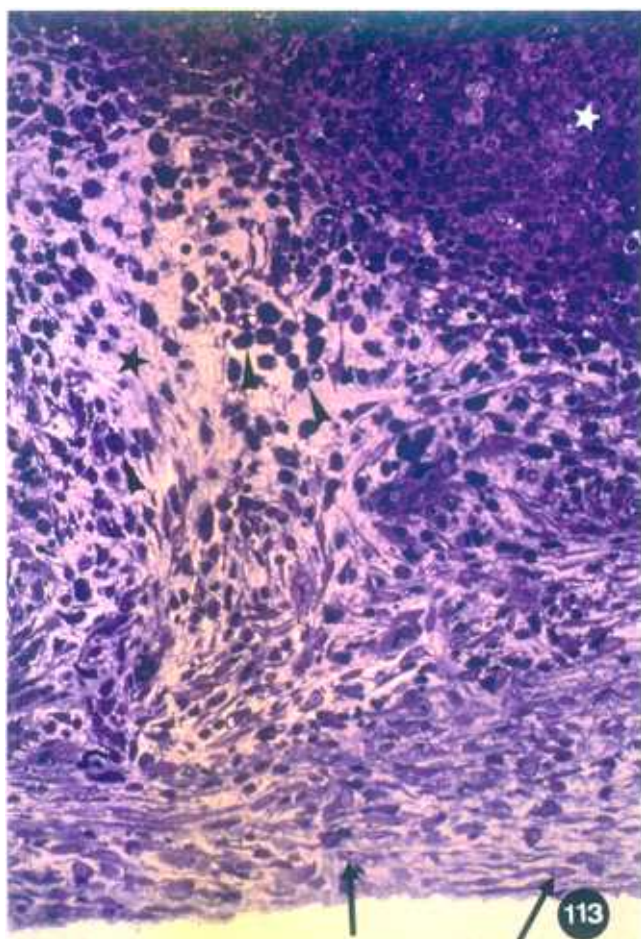



Figura 117. Fragmento de timo de rata cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días tratado con dGuo 1,35mM, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 5 días después del trasplante. En la parte más cercana a los túbulos renales se observaban células no linfoides con núcleo claro y la cromatina condensada perinuclear con un nucléolo patente, de posible naturaleza epitelial () . x400.






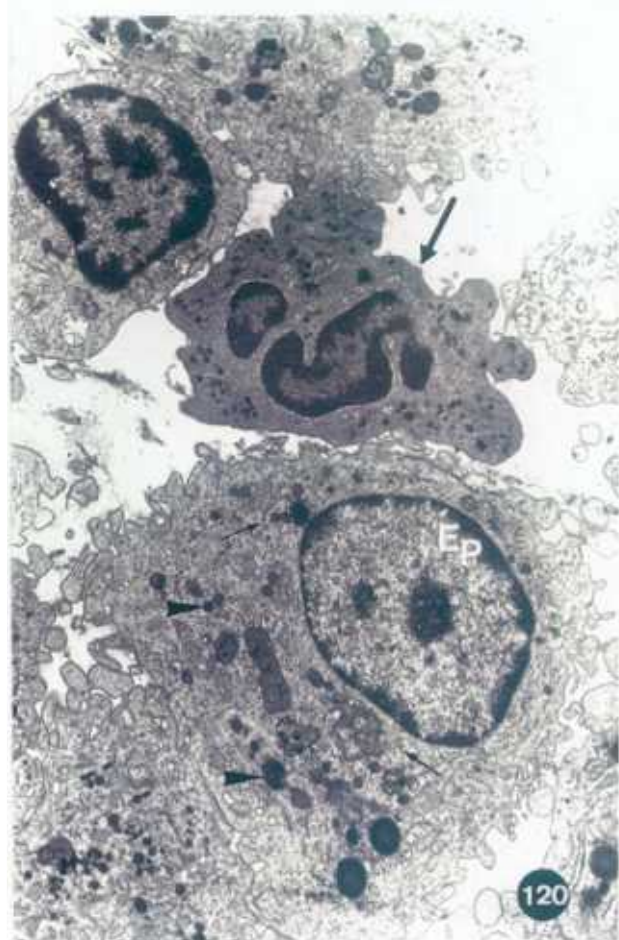
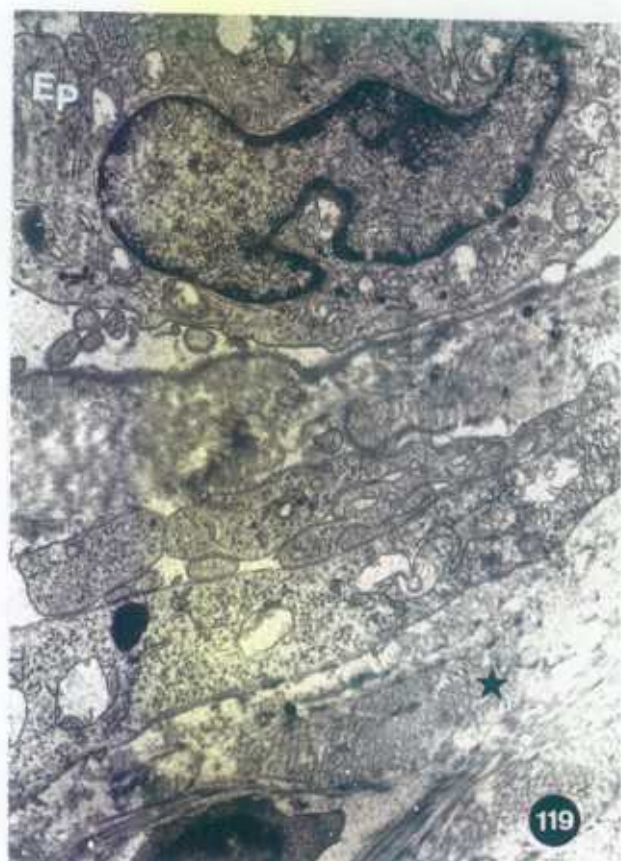
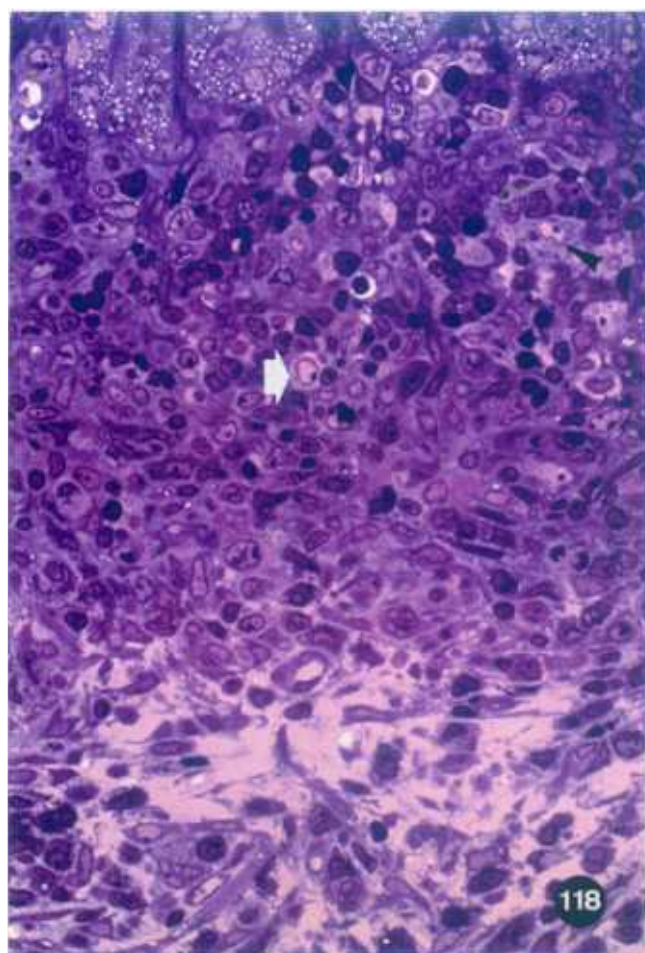
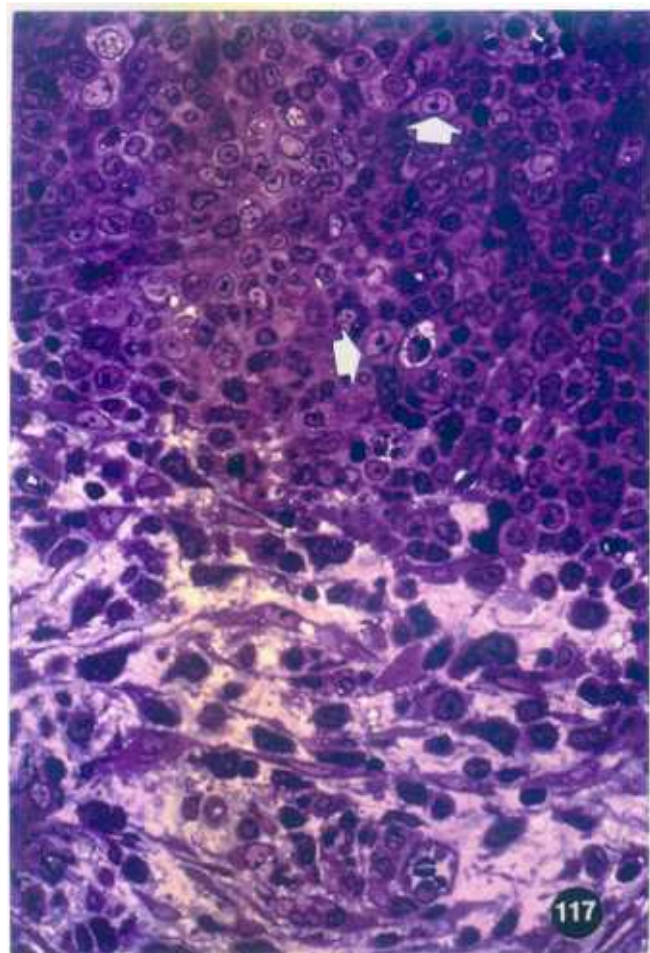
Figura 118. Fragmento de timo de rata cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días tratado con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 5 días después del trasplante. Detalle que muestra el tejido situado entre el riñón y el trasplante. Además de posibles células epiteliales similares a las descritas en la Fig. 117 () , se observan células cuya morfología recuerda a la de las IDC () . x400.

Figura 119. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 2 días después del trasplante. Células epiteliales (Ep) de aspecto primitivo dispuestas entre masas de colágena (★) en la parte más externa del trasplante, formando capas aplanadas. x14.000.

Figura 120. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 2 días después del trasplante. Células epiteliales (Ep) debajo de la capa superficial, junto a granulocitos heterófilos () . Notar las prolongaciones redondeadas que emiten las células epiteliales para interaccionar unas con otras y la presencia de abundante RER () y gránulos densos a los electrones en su citoplasma () . x4.500.





**Figura 121.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 2 días después del trasplante. Células epiteliales (Ep) en la zona intermedia del trasplante con RER muy desarrollado (►) y gránulos densos a lo electrones (→). x12.000.

**Figura 122.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 2 días después del trasplante. Las células epiteliales (Ep) forman un estroma más compacto, entre masas de colágeno (●), en la zona más profunda del trasplante. x6.000.

**Figura 123.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 2 días después del trasplante. Células epiteliales (Ep) de la parte más profunda del trasplante, poco densas a los electrones y con los orgánulos citoplásmicos (►) cercanos al núcleo (Nu): x6.000.

**Figura 124.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 2 días después del trasplante. Célula epitelial (Ep) de la parte más profunda del trasplante, poco densa a los electrones, con cisternas muy alargadas de RER (◄). x14.000.



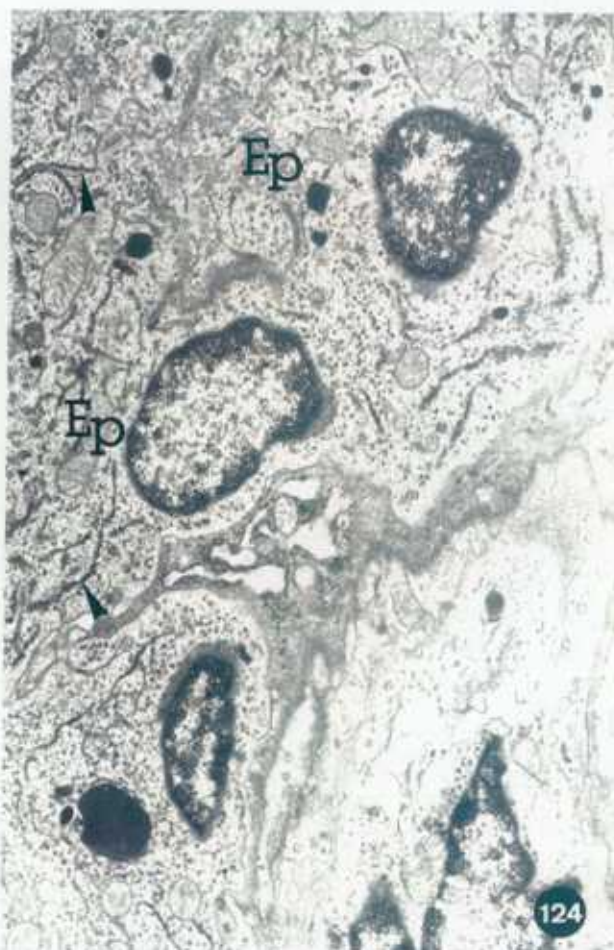
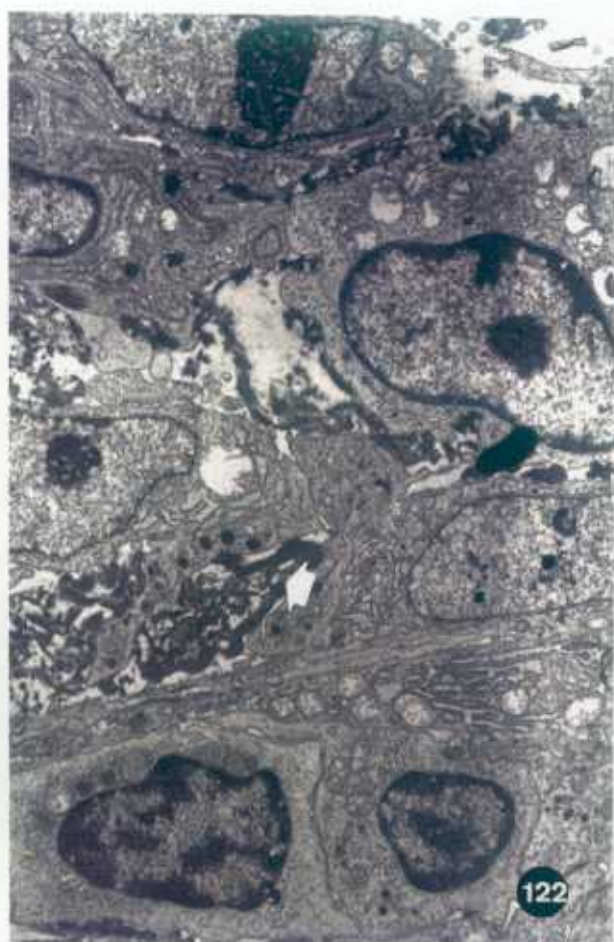
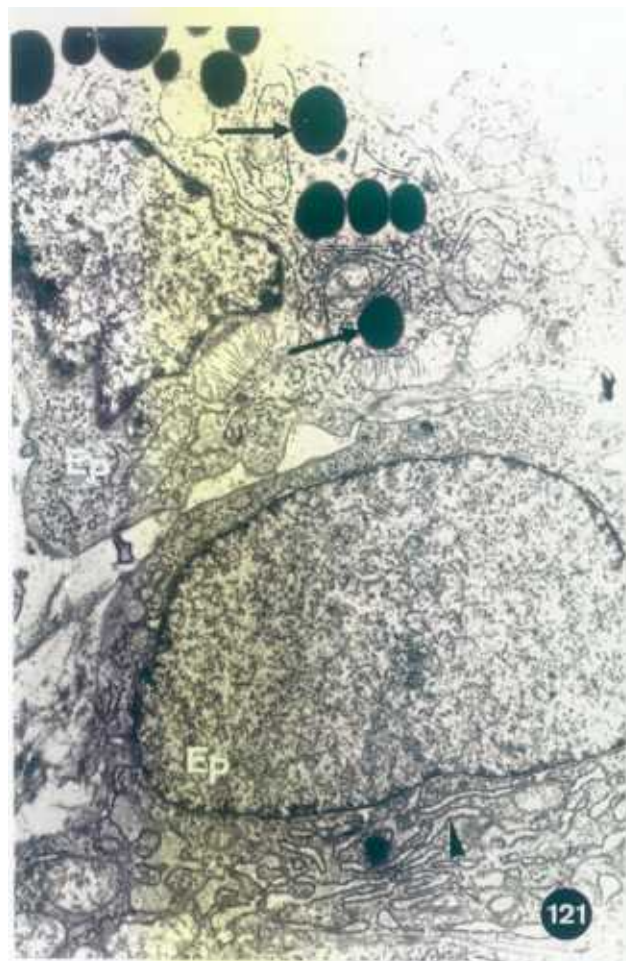




Figura 125. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 2 días después del trasplante. Células irregulares y alargadas, muy densas a los electrones (►), entre las células epiteliales (Ep) de la parte profunda del trasplante. Nótese la peculiar dilatación de las cisternas de RER (→) en estas células. R, túbulo renal. x6.000.

Figura 126. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 2 días después del trasplante. Las células electrodensas presentaban cisternas irregulares y dilatadas de RER (◐), abundantes mitocondrias redondeadas (→) y polirribosomas (\*). x14.000.

Figura 127. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Masa de células epiteliales (Ep) entre las que podría haber algunos linfocitos (L). R, túbulo renal; (→), célula electrodensa. x6.000.

Figura 128. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Notar la presencia de células epiteliales (Ep) alargadas con largas prolongaciones citoplásmicas de la parte profunda del trasplante. (→), células electrodensas similares a la de la Fig. 127. x6.000.

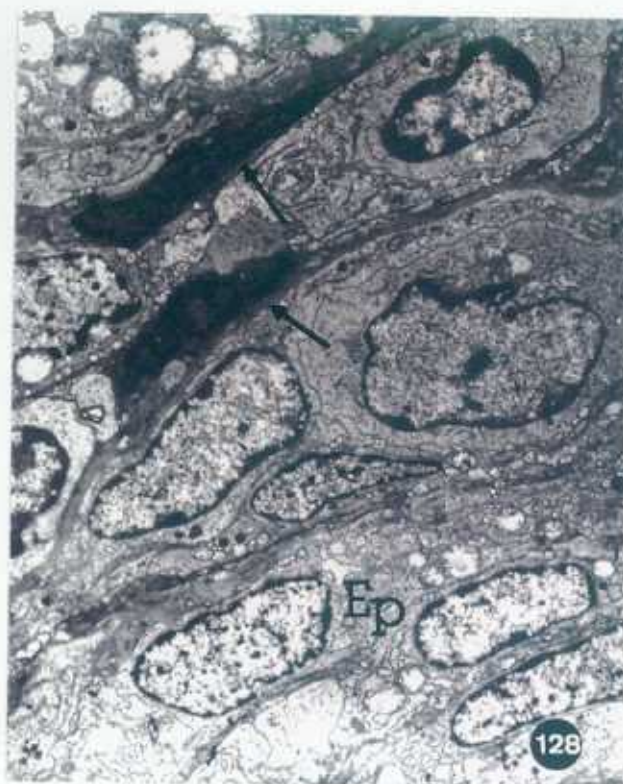
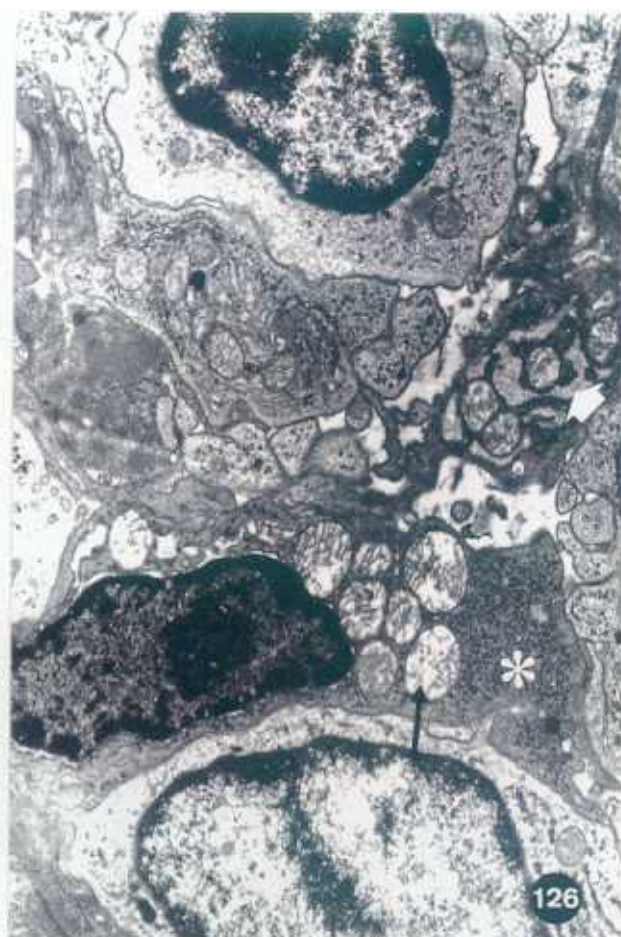


Figura 129. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Quistes intracitoplásmicos (→) en el citoplasma de una célula epitelial (Ep) de la parte profunda del trasplante. x8.800.

Figura 130. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Células barrera (★) entre las masas compactas de células epiteliales (Ep). Notar la abundancia de RER que exhiben y la dilatación de sus cisternas (◀). x12.000.

Figura 131. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Célula con numerosos pliegues e interdigitaciones en la membrana plasmática (→), con una disposición perinuclear de sus orgánulos que recuerda a las IDC tímicas. x12.000.

Figura 132. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Células fagocíticas (★) con abundantes restos celulares en su citoplasma (→). x8.800.



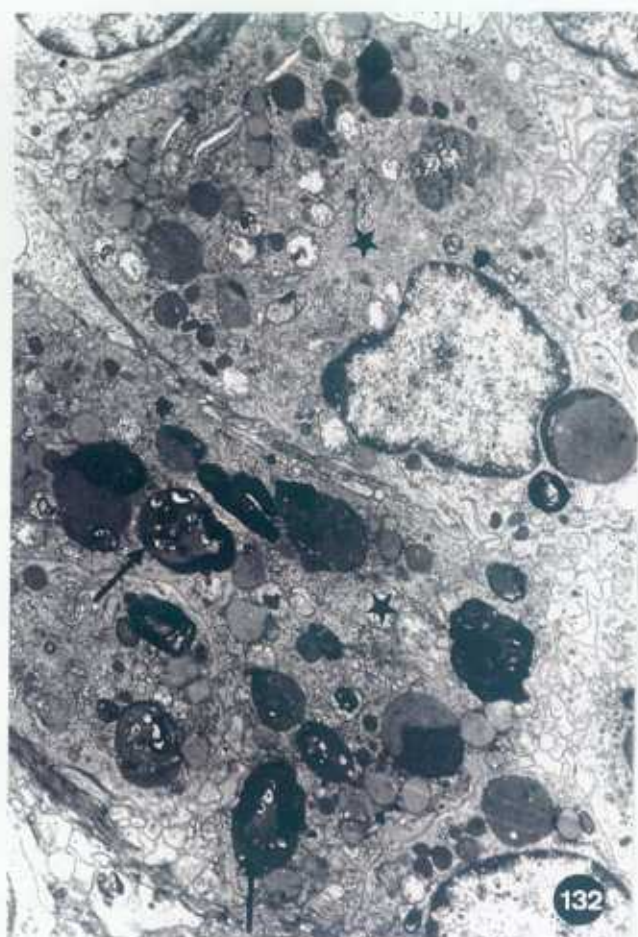
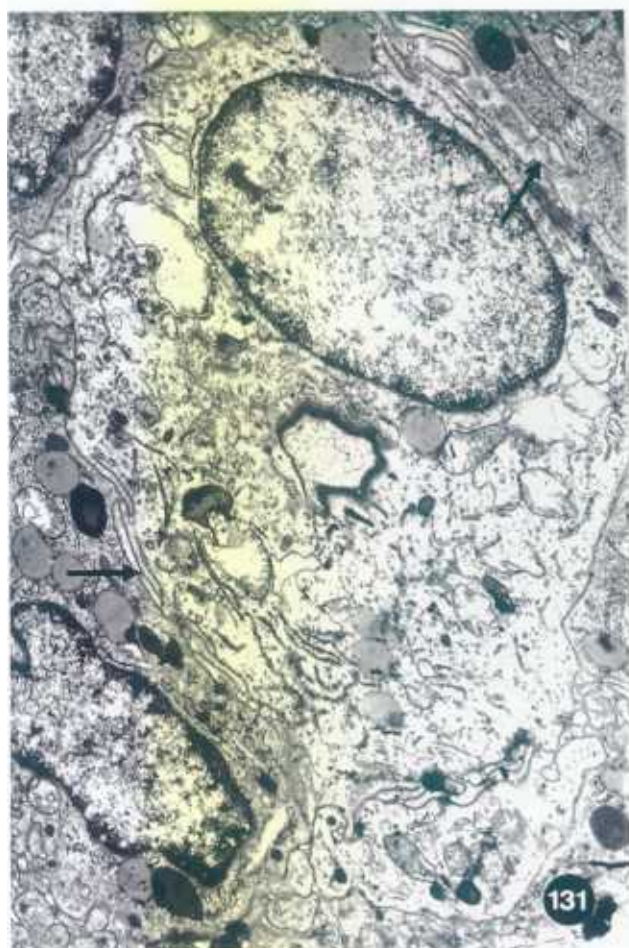
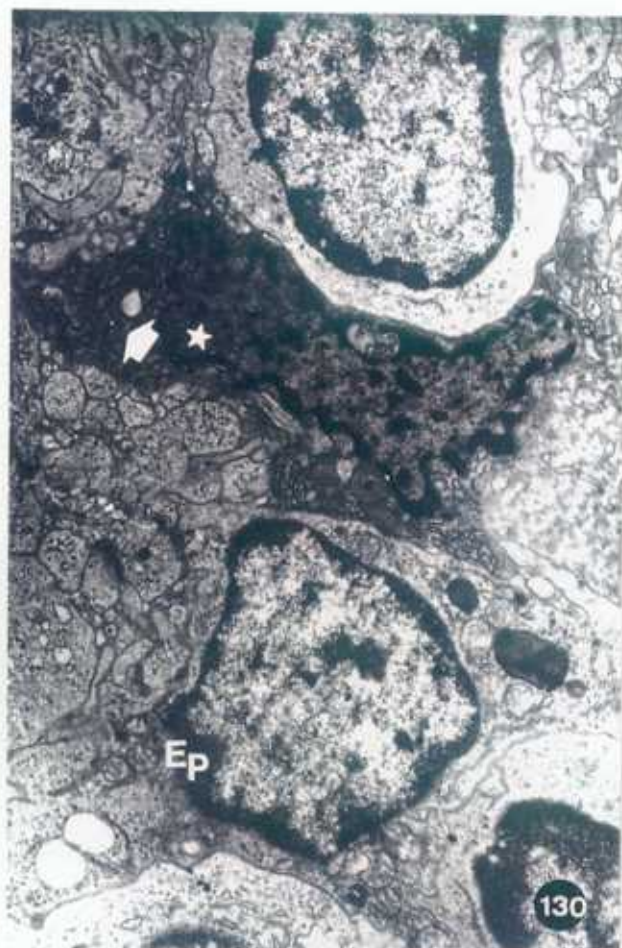
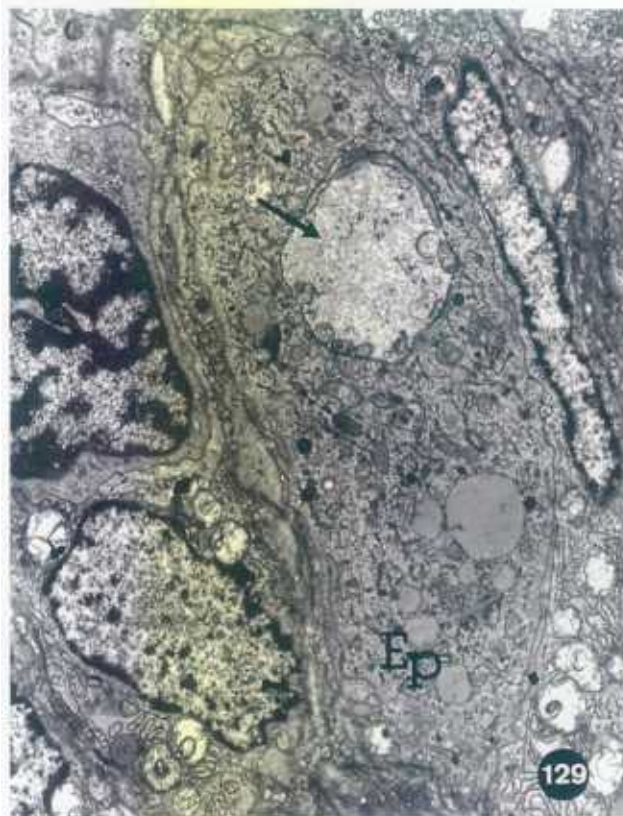


Figura 133. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 2 días después del trasplante. Células epiteliales muy primitivas (Ep) con núcleos voluminosos (Nu), escasa cromatina condensada, pocos orgánulos citoplásmicos y un nucléolo patente (→), situadas en la parte periférica del trasplante. Notar sus incipientes desmosomas (▶) y contactos superficiales con las células vecinas (→). x24.000.

Figura 134. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 2 días después del trasplante. Célula epitelial primitiva (Ep) en división en la zona más externa del fragmento trasplantado. Se observan tonofilamentos (◄) y (→) desmosomas. x19.000.

Figura 135. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 2 días después del trasplante. Célula epitelial (Ep) en la zona próxima al riñón rodeada de grandes espacios intercelulares y sustancia fundamental (→). (◄) gránulos; (→) aparato de Golgi. x10.000.

Figura 136. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Células epiteliales primitivas (Ep) que forman capas aplanadas en la parte periférica del trasplante, entre sustancia fundamental (→). x10.000.



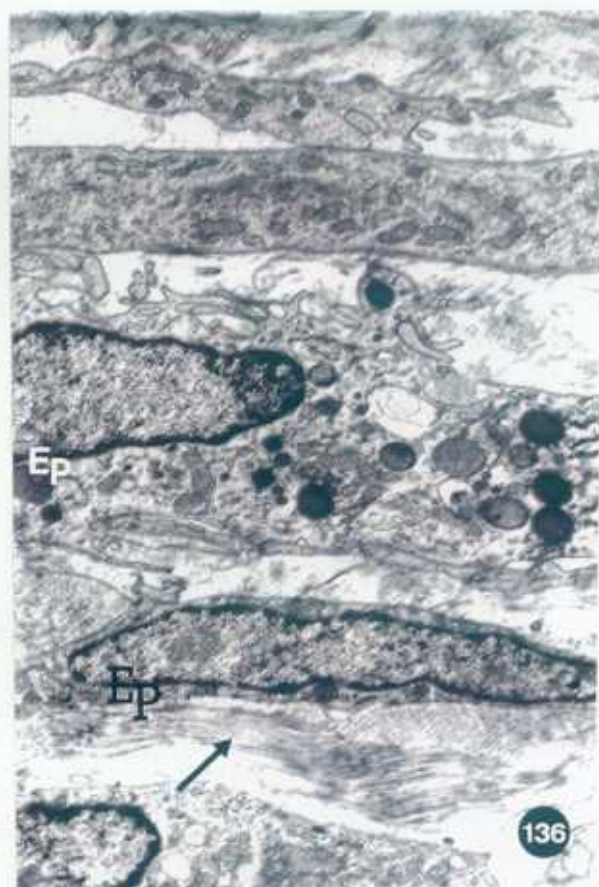
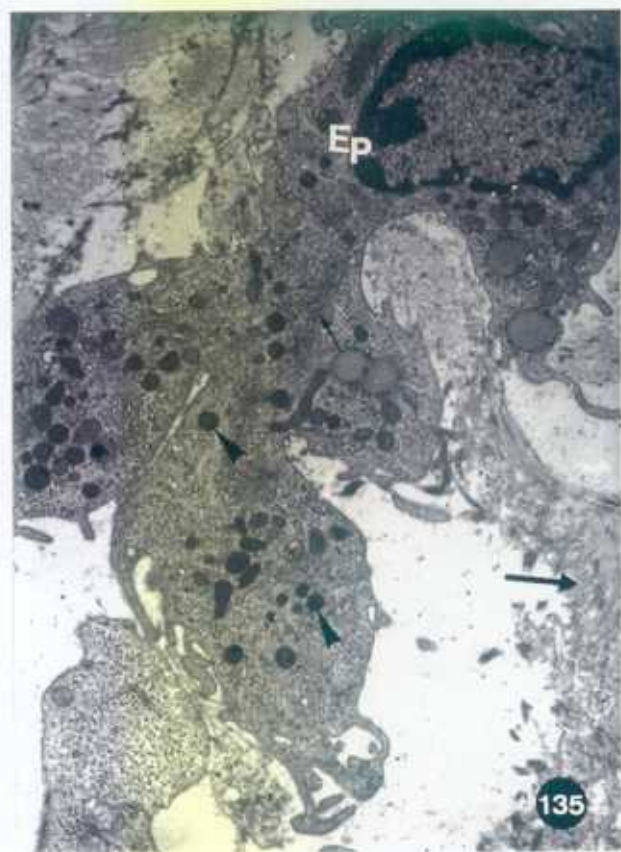
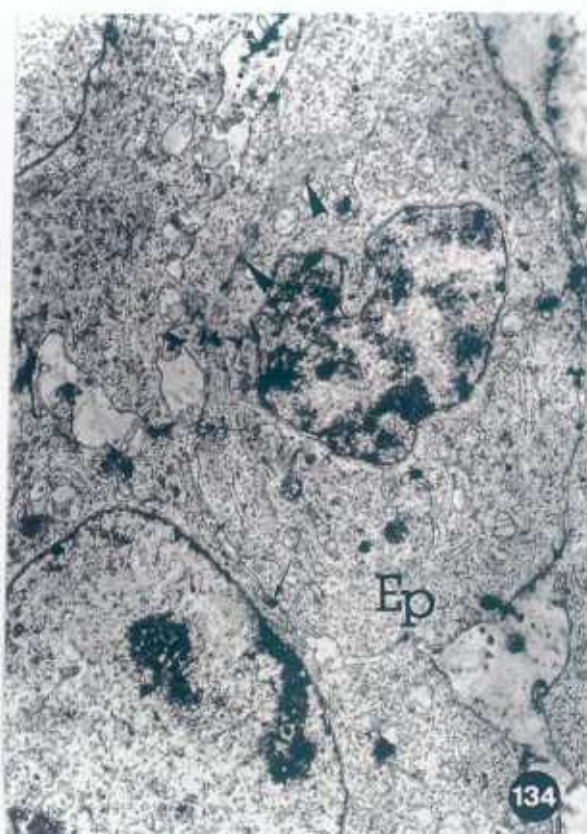
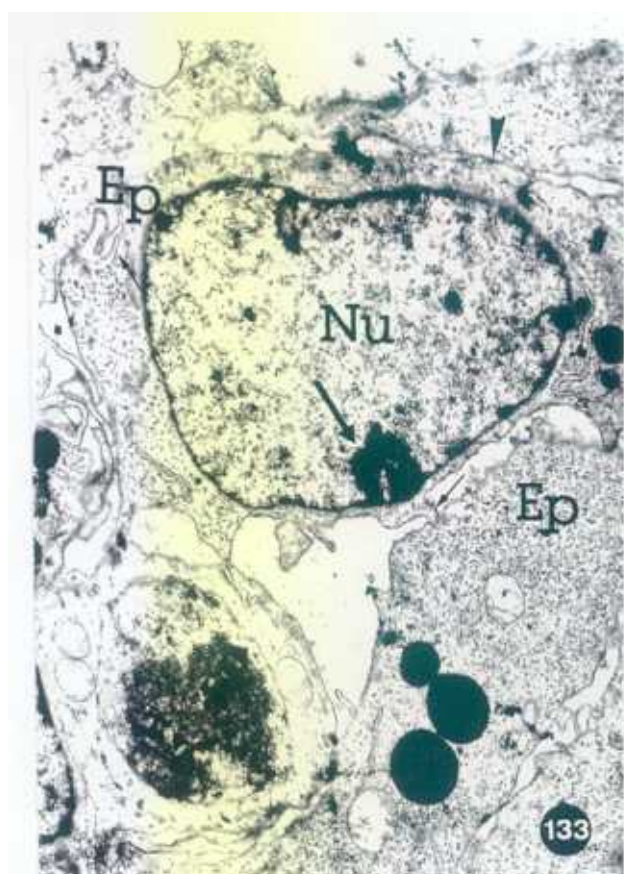


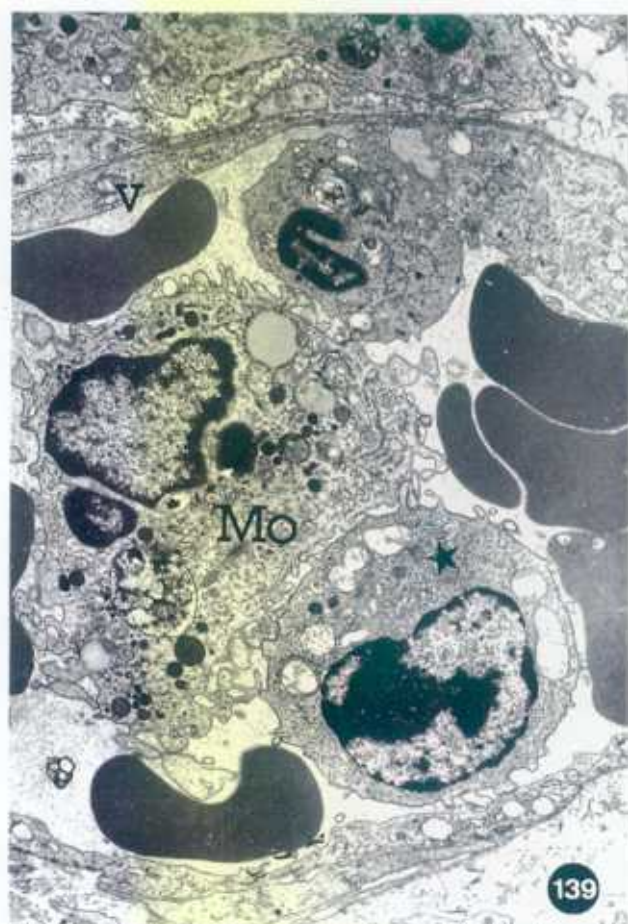
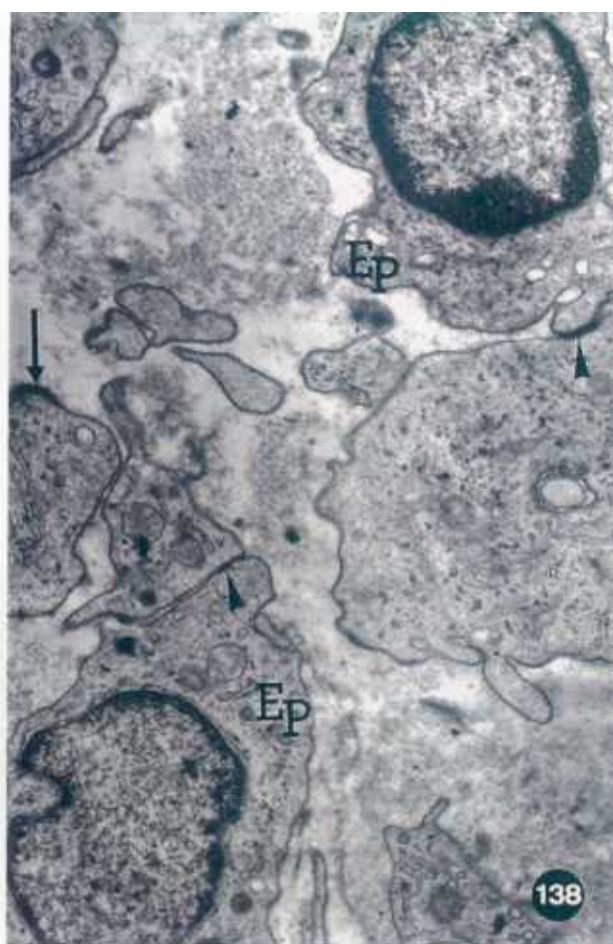
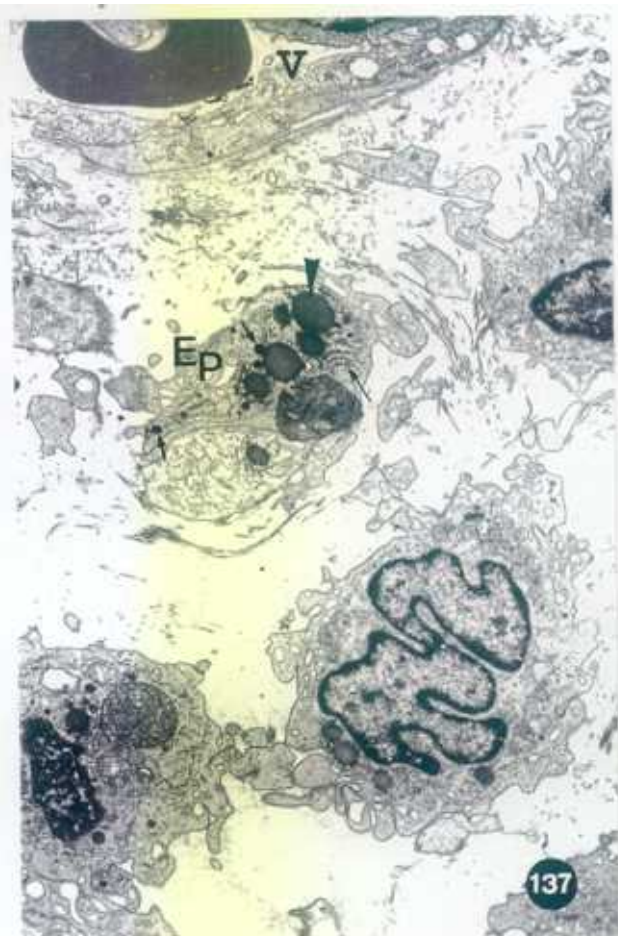
Figura 137. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Zona intermedia del trasplante con células epiteliales (Ep) redondeadas, entre sustancia fundamental, cercanas a vasos sanguíneos (v). Algunas células epiteliales contienen largos perfiles de RER (←), gotas lipídicas (►) y pequeños gránulos citoplásmicos densos a los electrones (←). x4.500.

Figura 138. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Células epiteliales muy primitivas (Ep) de la zona intermedia del fragmento trasplantado uniéndose mediante desmosomas con células próximas (◄). Notar los engrosamientos (→) que se forman en algunas de las prolongaciones de dichas células. x14.000.

Figura 139. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Células monocíticas (Mo) y linfoblastos (★) en el interior de los vasos sanguíneos (v) de la zona intermedia del trasplante. x6.000.

Figura 140. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Células epiteliales (Ep) pálidas con numerosos gránulos citoplásmicos (←) e interdigitaciones superficiales (◄). x4.500.





**Figura 141.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Célula epitelial en igual zona que la descrita en la Fig. 140, pero más diferenciada, con largos perfiles de RER ( ← ), Golgi bien desarrollado ( → ) y numerosas mitocondrias ( ◀ ). Nu, núcleo. x10.000.

**Figura 142.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Célula epitelial en división en la zona cercana a los túbulos renales. x11.000.

**Figura 143.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Grupos de células epiteliales (Ep) formando estructuras laminares similares a los corpúsculos de Hassall. x5.000.

**Figura 144.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Célula epitelial (Ep) de las paredes del corpúsculo de Hassall de la Fig. 143. Observar las proyecciones digitiformes emitidas por las células ( → ) y los numerosos desmosomas que las unen ( ► ). x5.300.



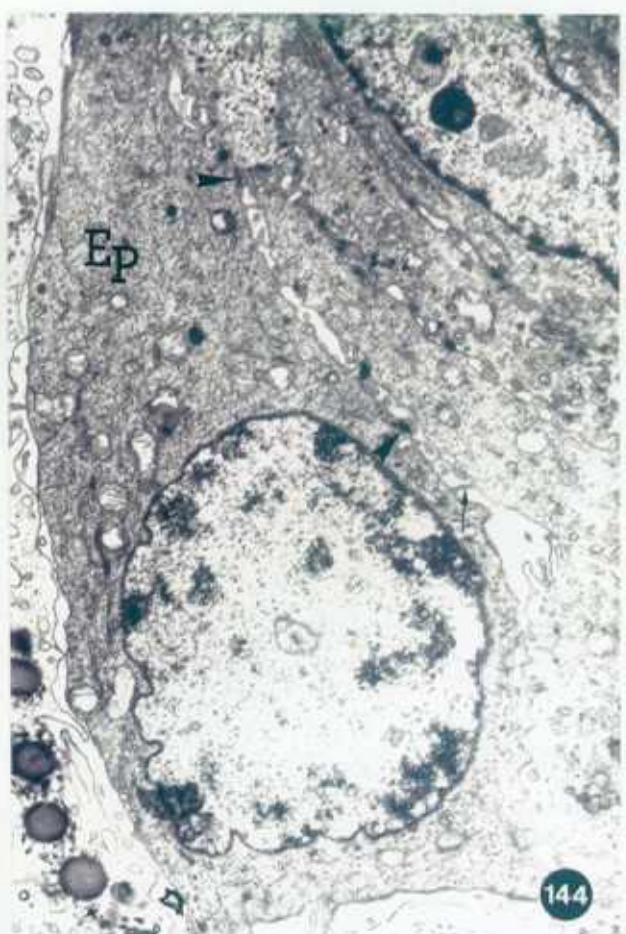
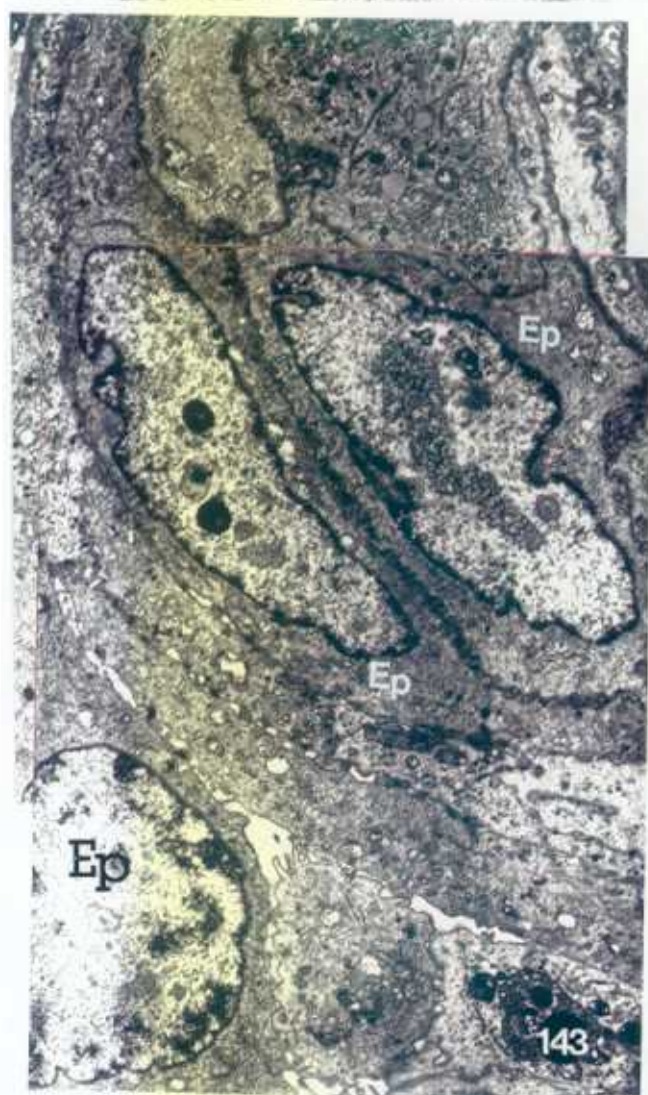
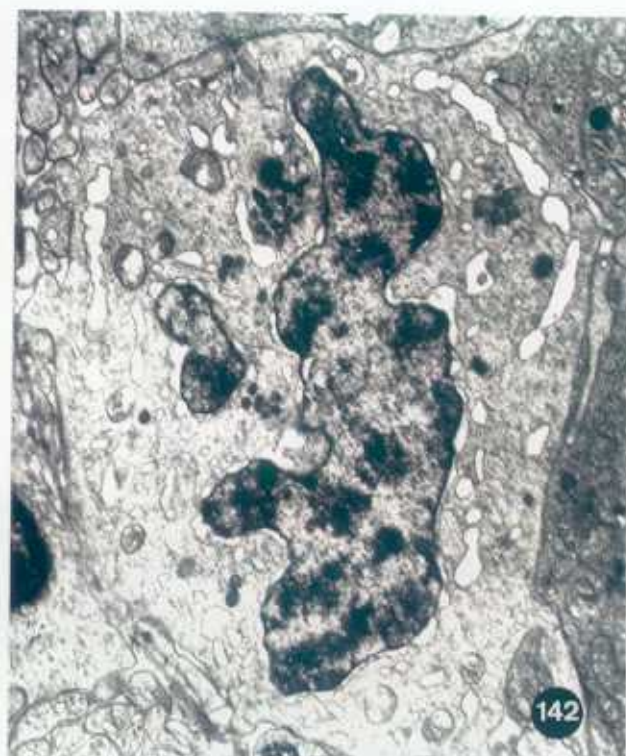
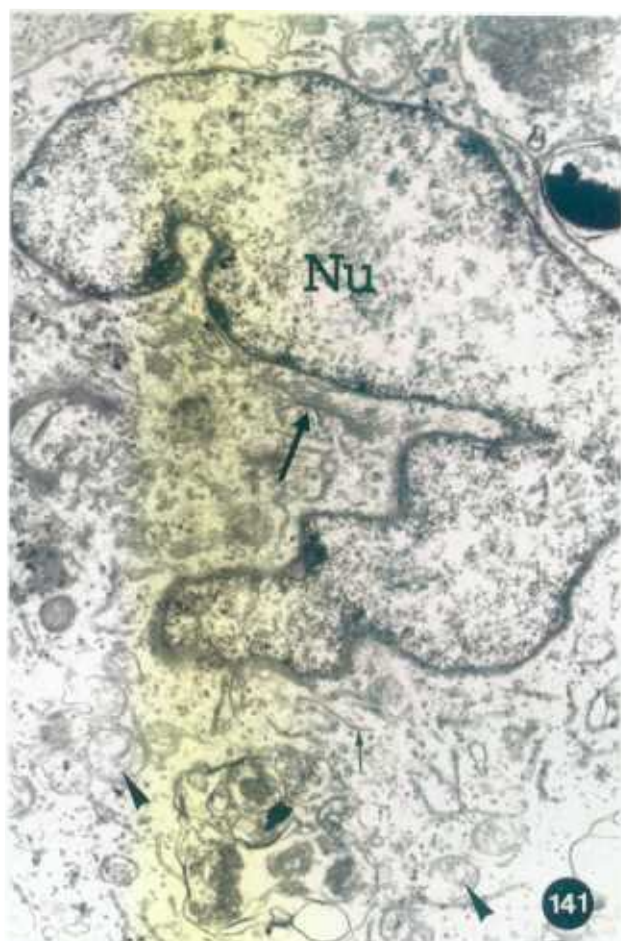


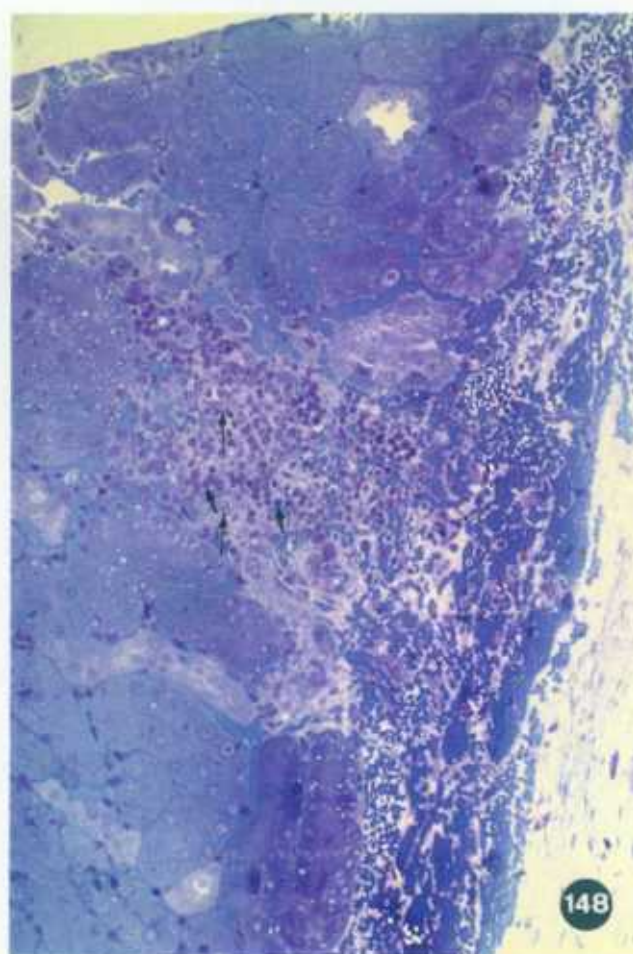
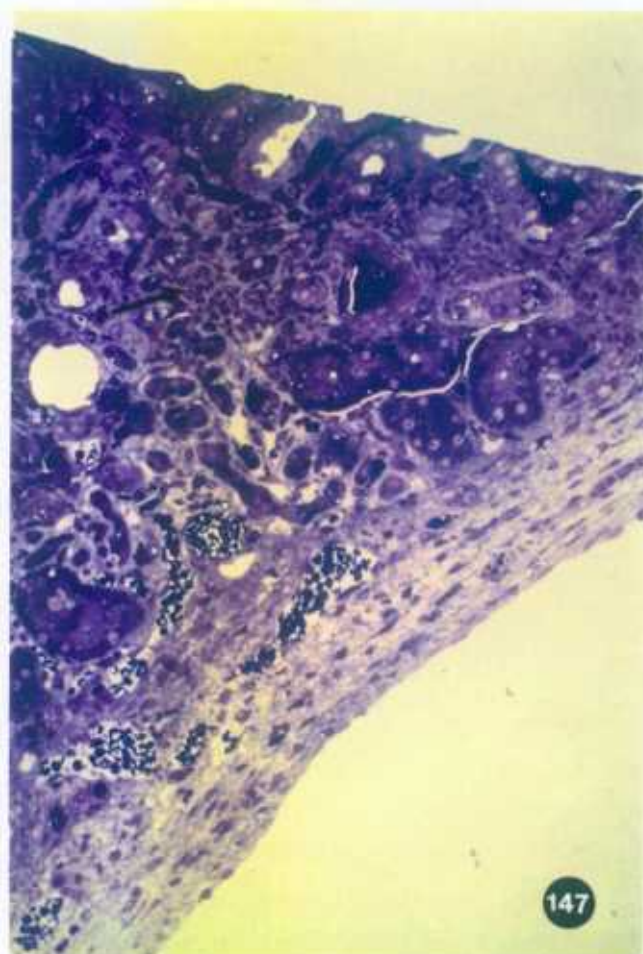
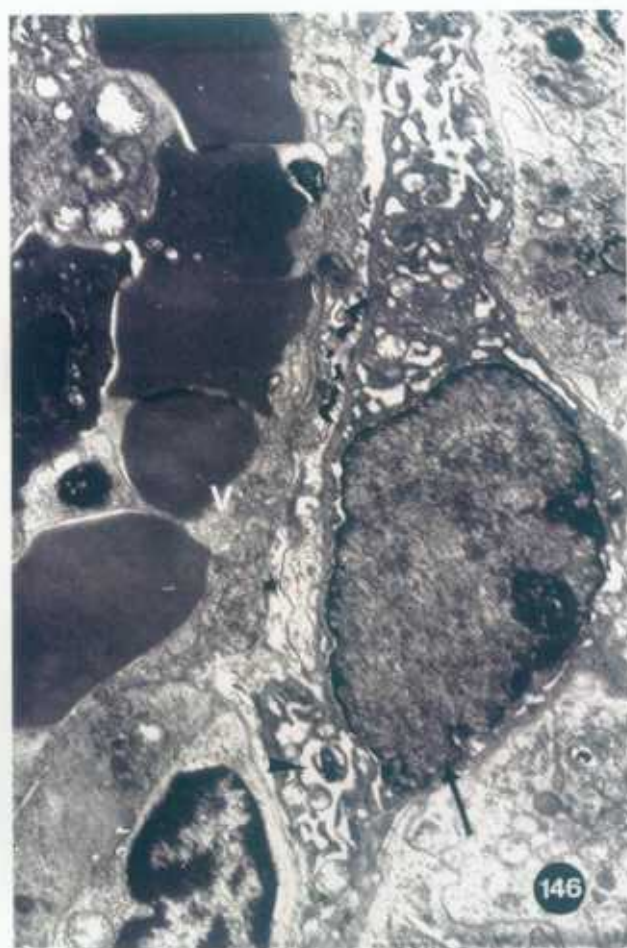
Figura 145. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Depósitos amorfos densos a los electrones (★) entre las células epiteliales de los corpúsculos descritos en la Fig. 143. x26.000.

Figura 146. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 5 días después del trasplante. Célula barrera (→) con las características dilataciones en las cisternas del RER (▶), cercana a las paredes de los vasos (v). x4.400.

Figura 147. Fragmento de timo de rata cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 21 días después del trasplante. No se distinguen las zonas descritas a los 2 y 5 días y apenas se observa el tejido trasplantado, que ha quedado reducido a un pequeño infiltrado linfoide (→) entre los túbulos renales. x200.

Figura 148. Fragmento de timo de rata cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días tratado con dGuo 1,35mM, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 21 días después del trasplante. Como en los fragmentos control (Fig. 147), los restos del trasplante han quedado reducidos a unas pocas células de citoplasma claro (→) y un importante infiltrado linfoide (←). x400.





**Figura 149.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 21 días después del trasplante. La organización epitelial observada en los primeros días se ha perdido y únicamente se observan linfocitos (L) de diferentes tamaños en la zona profunda del trasplante. x7.500.

**Figura 150.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 21 días después del trasplante. Zona más externa del trasplante llena de linfocitos (L). x4.500.

**Figura 151.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 21 días después del trasplante. Macrófagos cargados de restos celulares (→) en el infiltrado celular que ha sustituido al estroma epitelial. Nu, núcleo. x7.500.

**Figura 152.** Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días con 1,35mM de dGuo, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica en combinación alogénica, 21 días después del trasplante. Ocasionalmente podían aparecer células plasmáticas (Pm) en la región que tuvo el trasplante y que ahora está reducida a un infiltrado linfoide. x21.000.



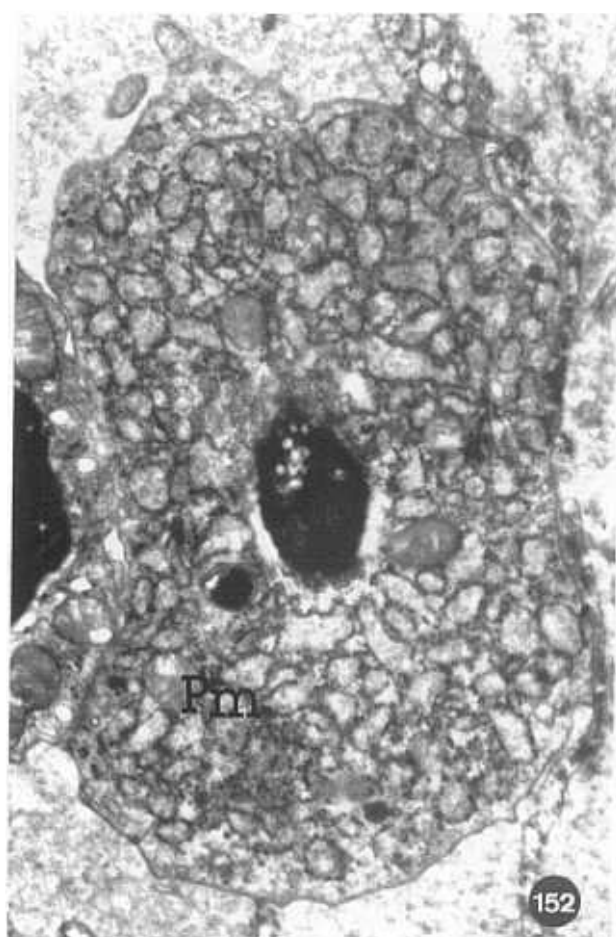
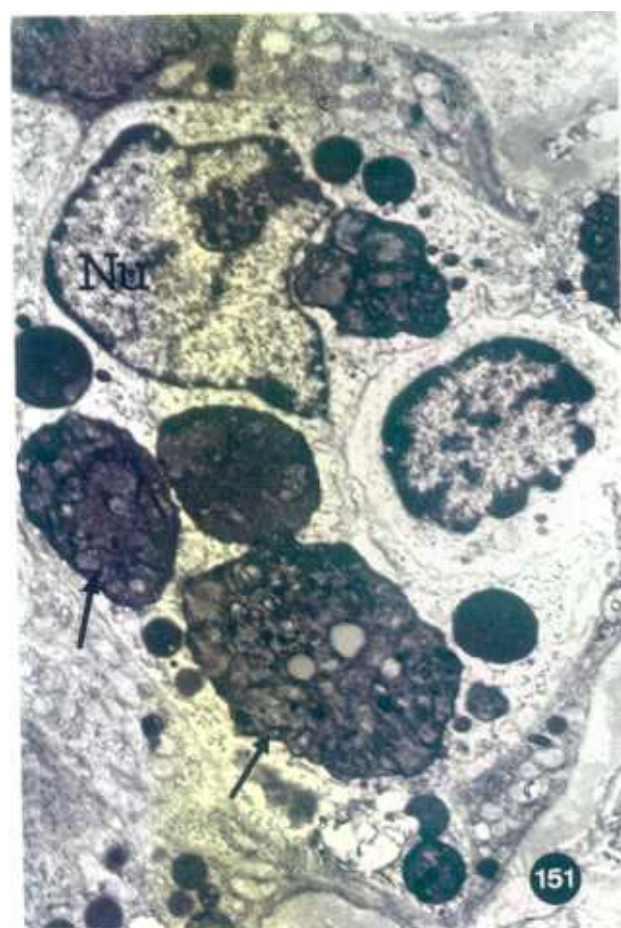
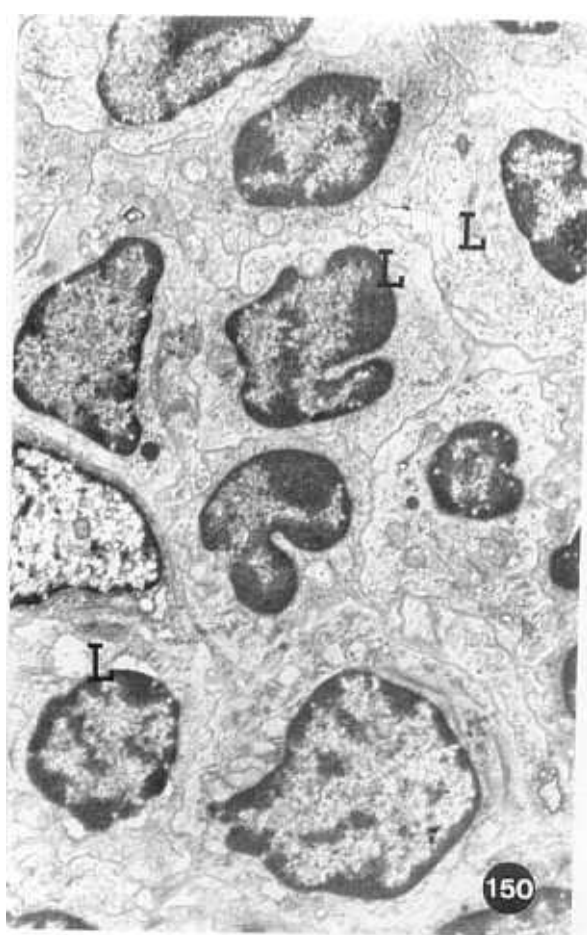
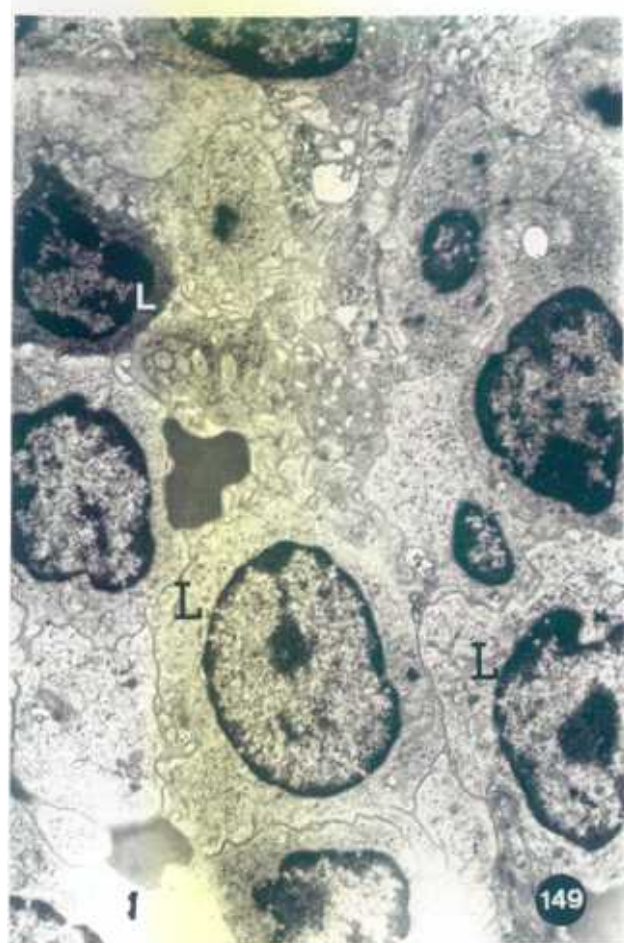


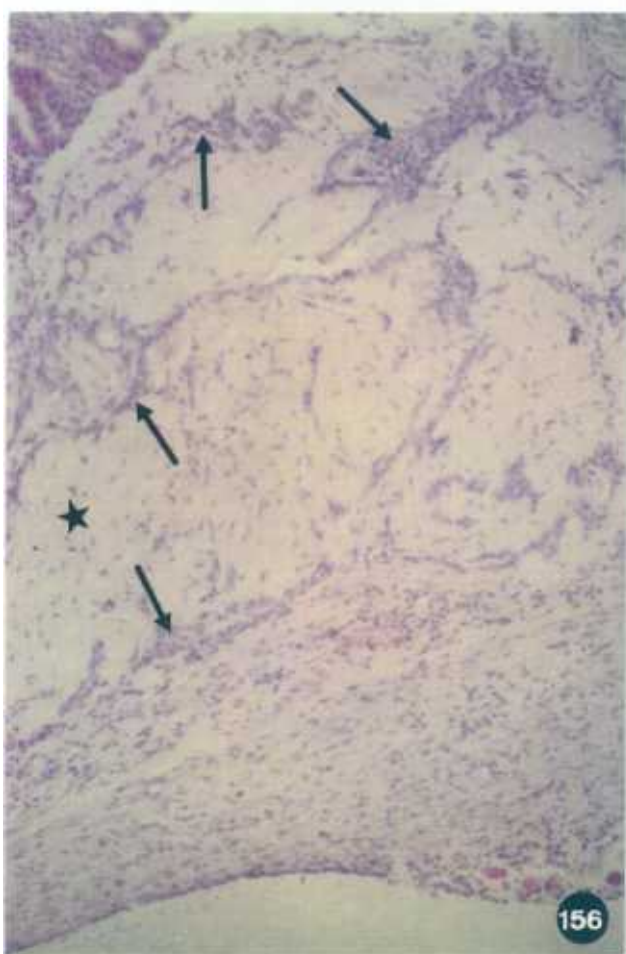
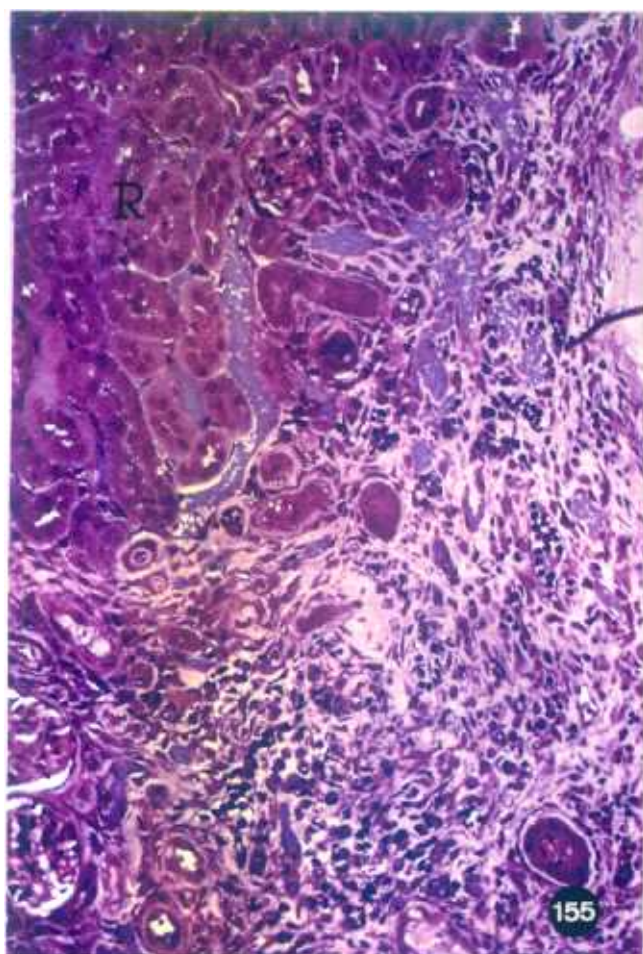
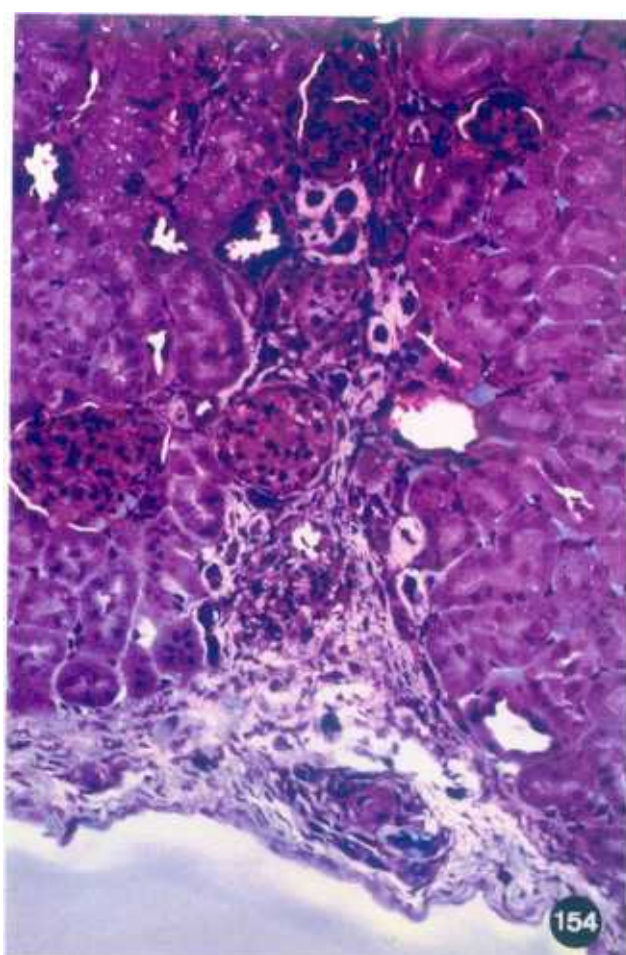
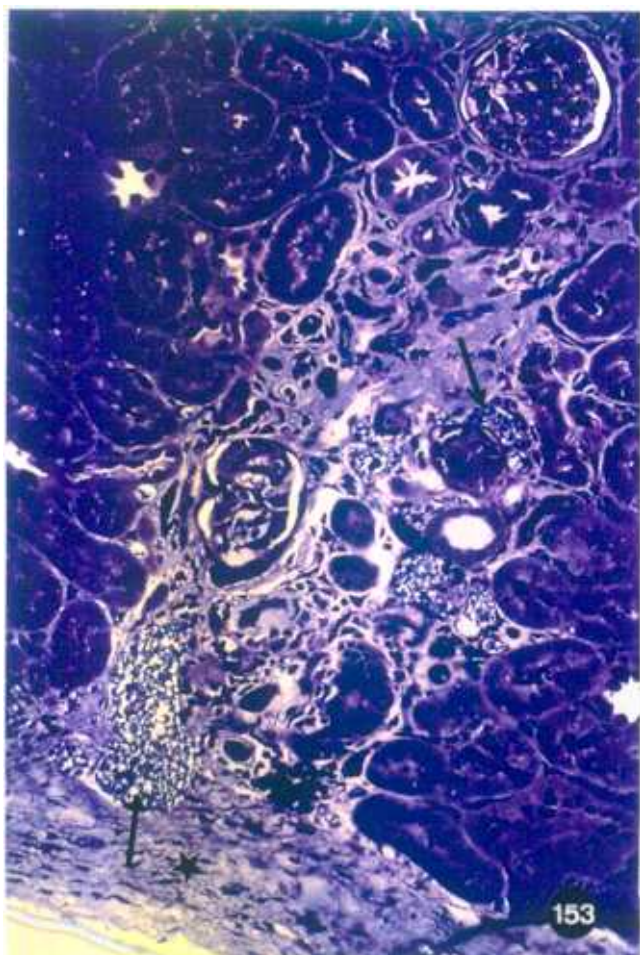
Figura 153. Fragmento de timo de rata cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días en medio control, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 28 días después del trasplante. Todos los restos del trasplante han desaparecido quedando únicamente restos de tejido conectivo (★) y vasos sanguíneos (→). x200.

Figura 154. Fragmento de timo de rata cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días tratado con dGuo 1,35mM, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata Wistar alogénica, 42 días después del trasplante. Como en los fragmentos control, el tejido trasplantado ha desaparecido por completo. x200.

Figura 155. Fragmento de timo cultivado adherido al soporte de cultivo durante 5 días tratado con dGuo 4,0mM, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata AO, 7 días después del trasplante. El tejido aparece formando una masa conectiva infiltrada por linfocitos. R, túbulo renal. x200.

Figura 156. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Se observan bandas de células epiteliales (→) entre una matriz de colágeno (★). x100.





**Figura 157.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Células epiteliales (►). x100.

**Figura 158.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Células epiteliales (►). x100.

**Figura 159.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. Se observa la colonización linfoide en áreas donde previamente existían bandas de células epiteliales (★). x100.

**Figura 160.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación singénica, 4 semanas después del trasplante. Al igual que en los fragmentos control, los linfocitos colonizan las bandas de células epiteliales (★). x100.



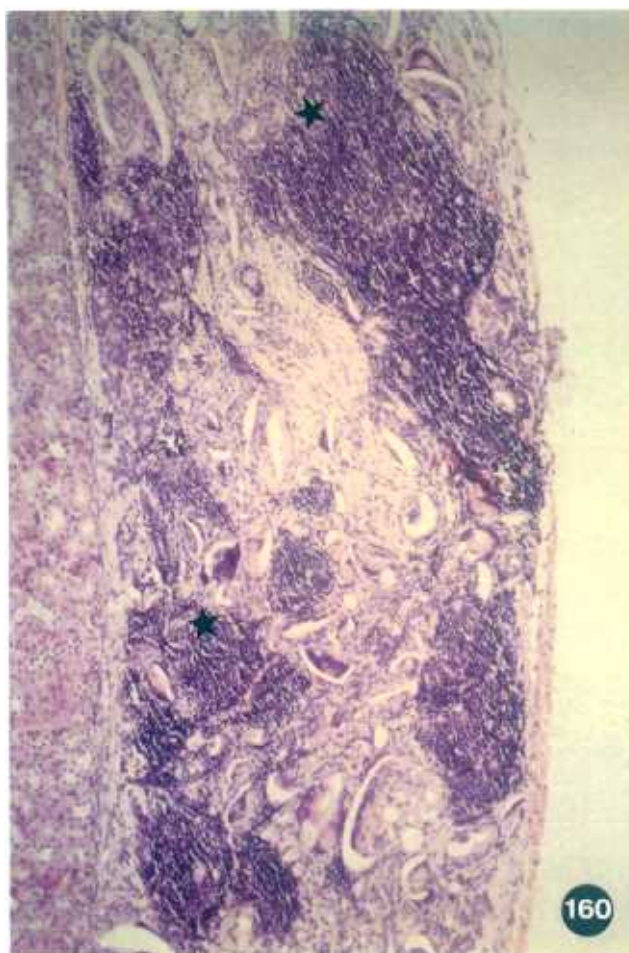
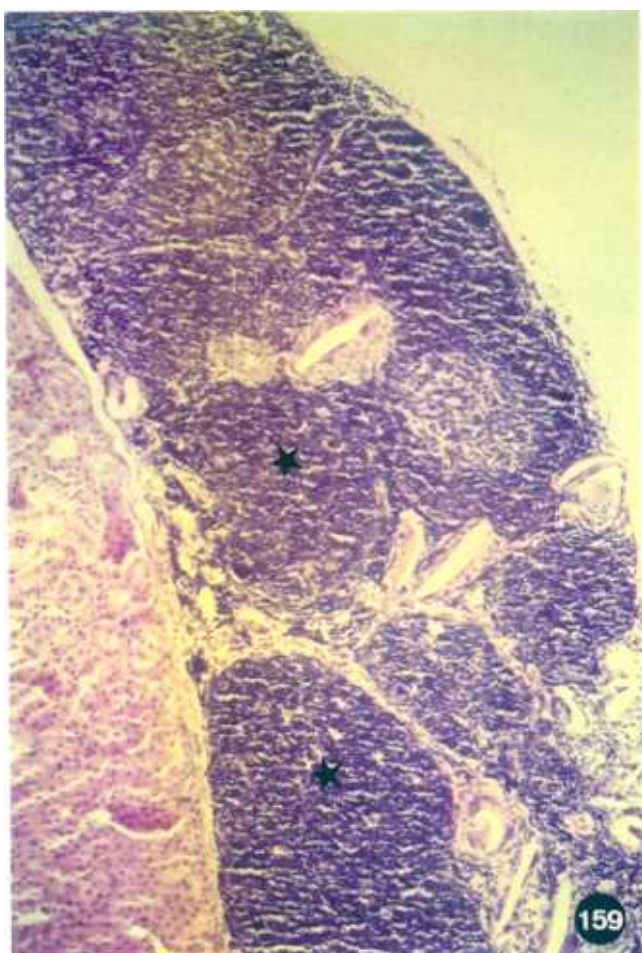
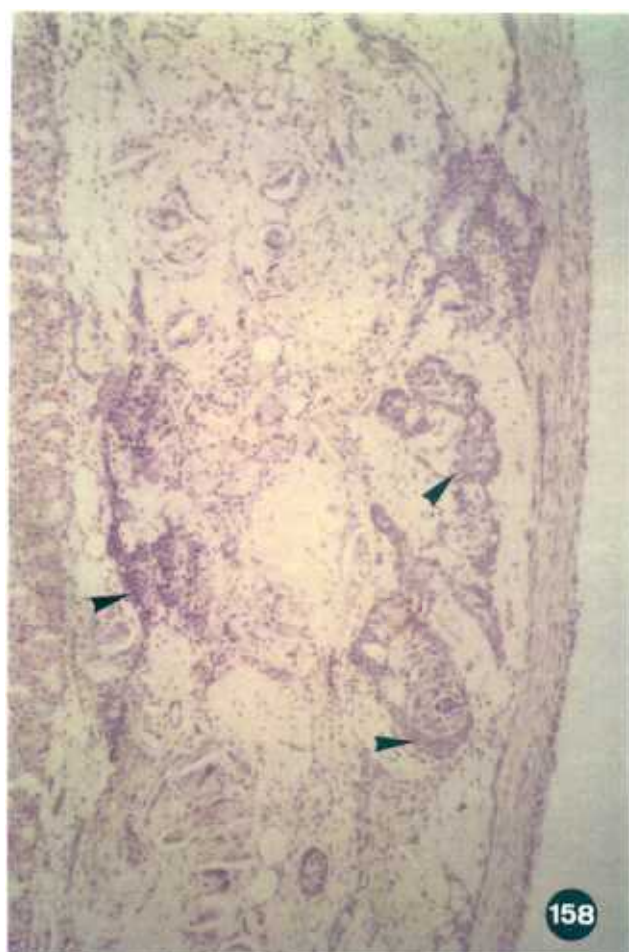
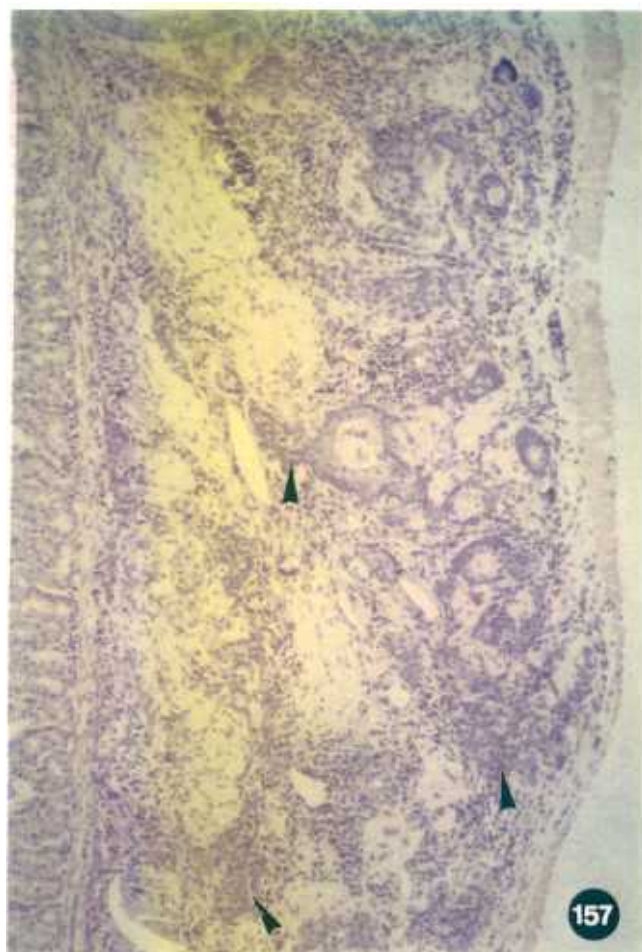


Figura 161. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0 $\mu$ g/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. Al igual que en los fragmentos control y tratados con dGuo (Figs. 159, 160) se observa la colonización linfoide del retículo epitelial ( $\blacktriangleleft$ ). x40.

Figura 162. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude" en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. Se distinguen zonas cuya histología recuerda a la observada in situ en corteza (C) y médula (M) tímicas. x100.

Figura 163. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. Se observa la recuperación de la citoarquitectura tímica con zonas que histológicamente se asemejan a la corteza (c) y médula (m) tímicas. x100.

Figura 164. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0 $\mu$ g/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. Al igual que en los fragmentos control (Fig. 162) y tratados con dGuo (Fig. 163) se observa la recuperación de la arquitectura tímica. (C) corteza; (M) médula. x100.



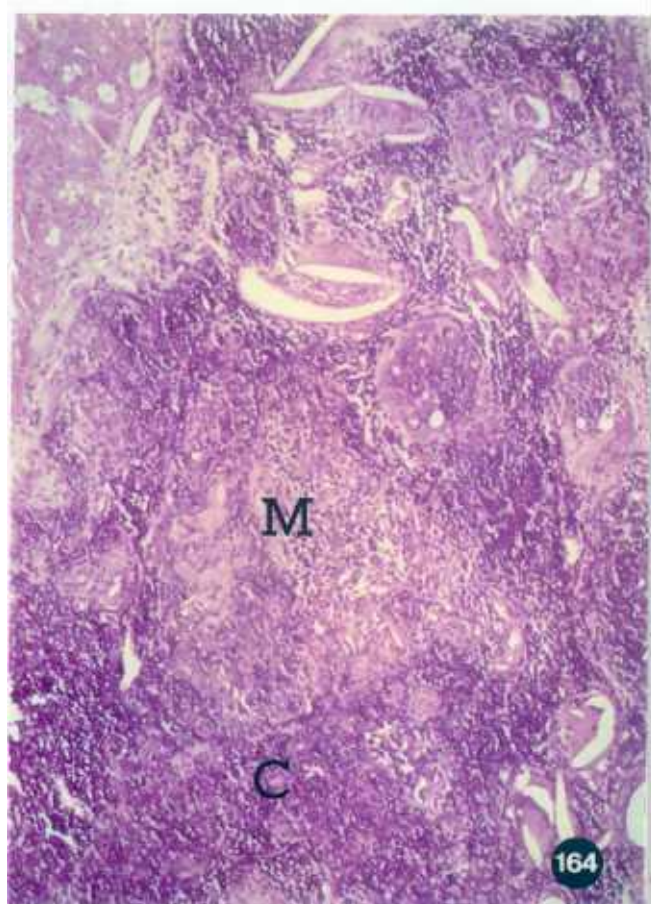
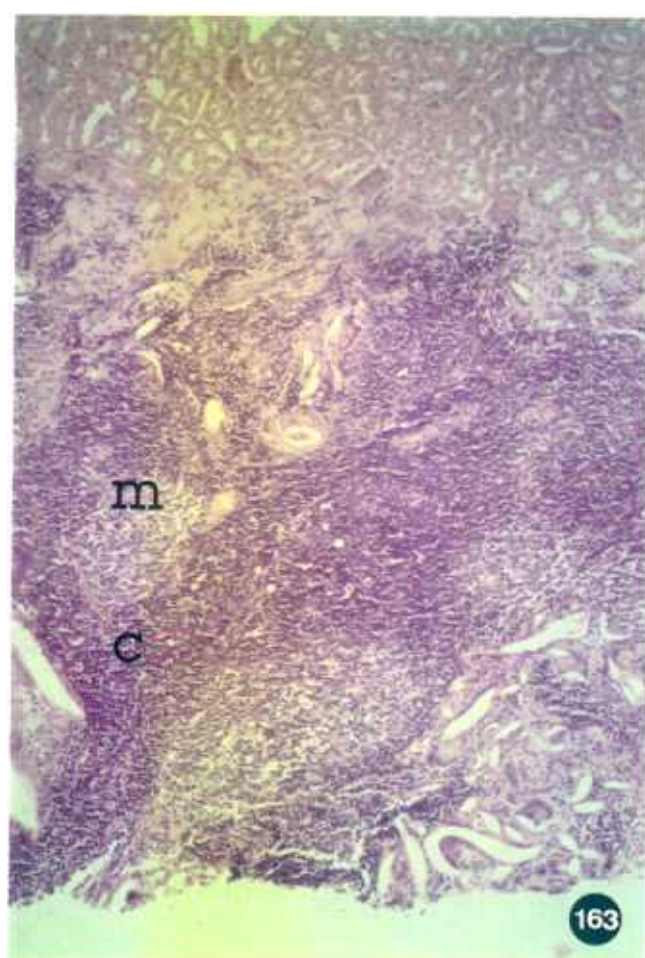
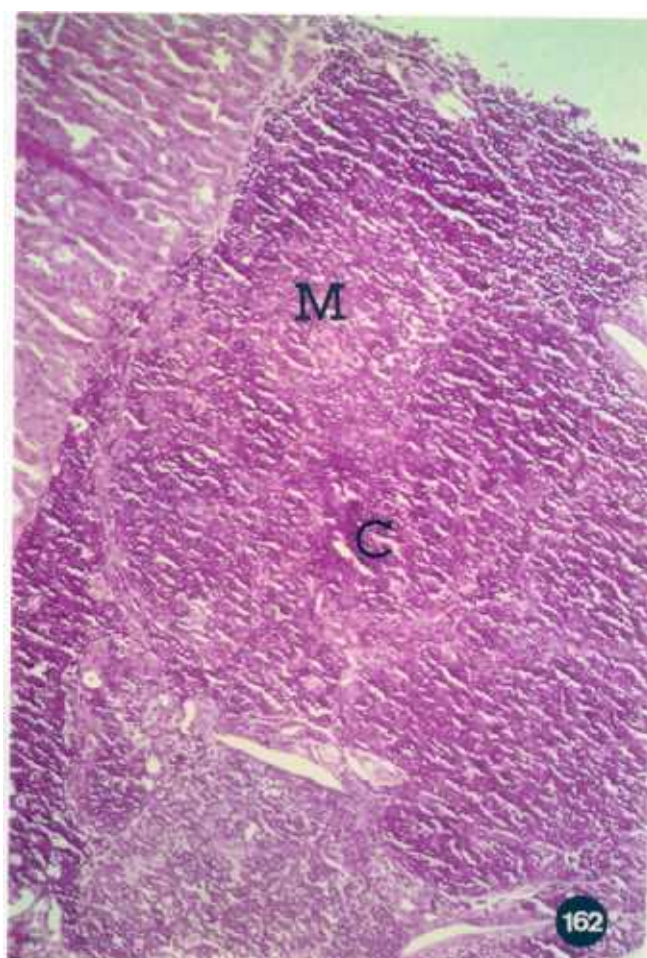
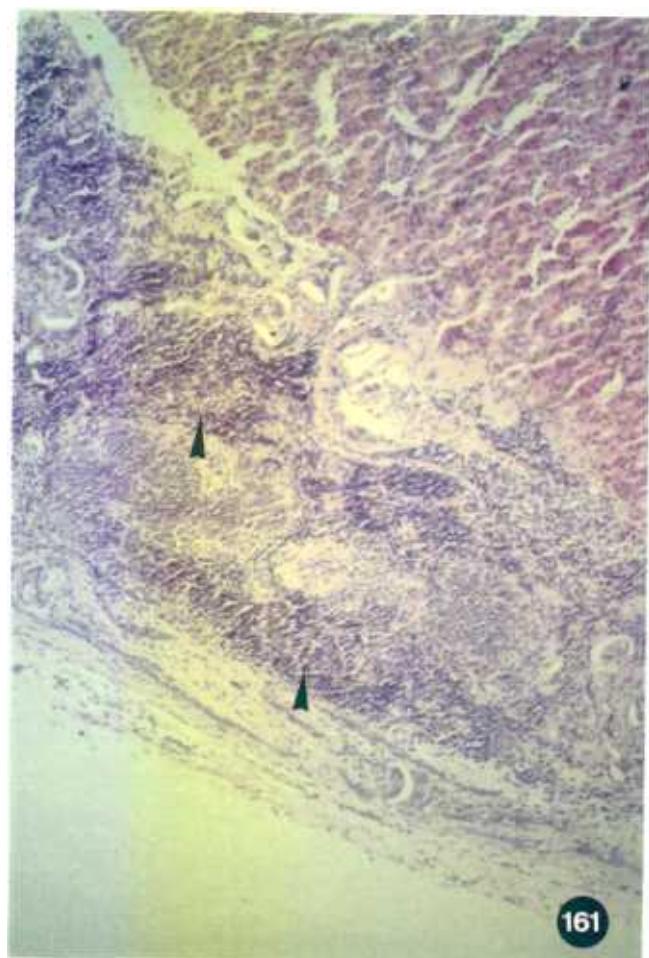


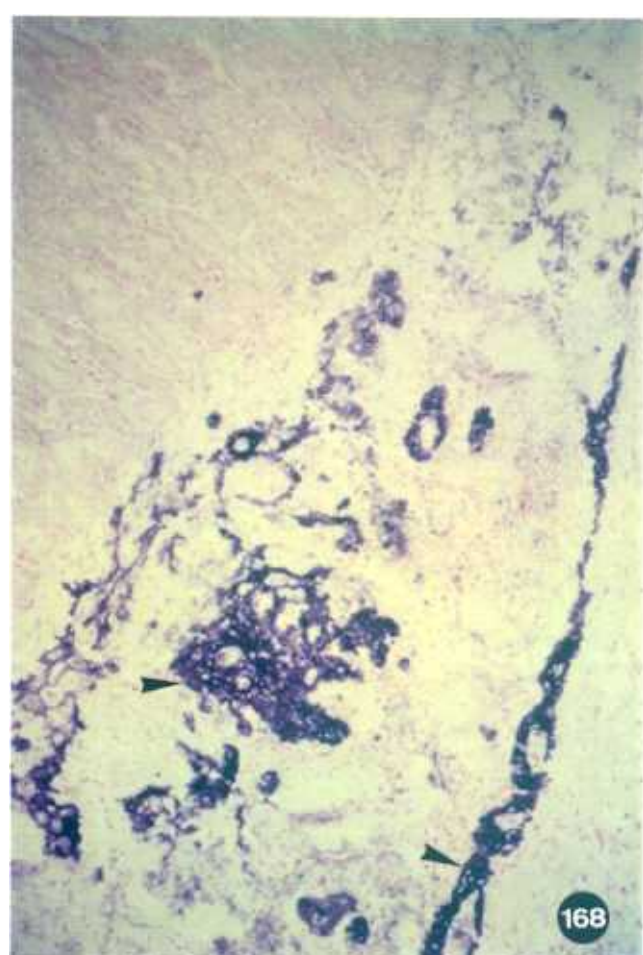
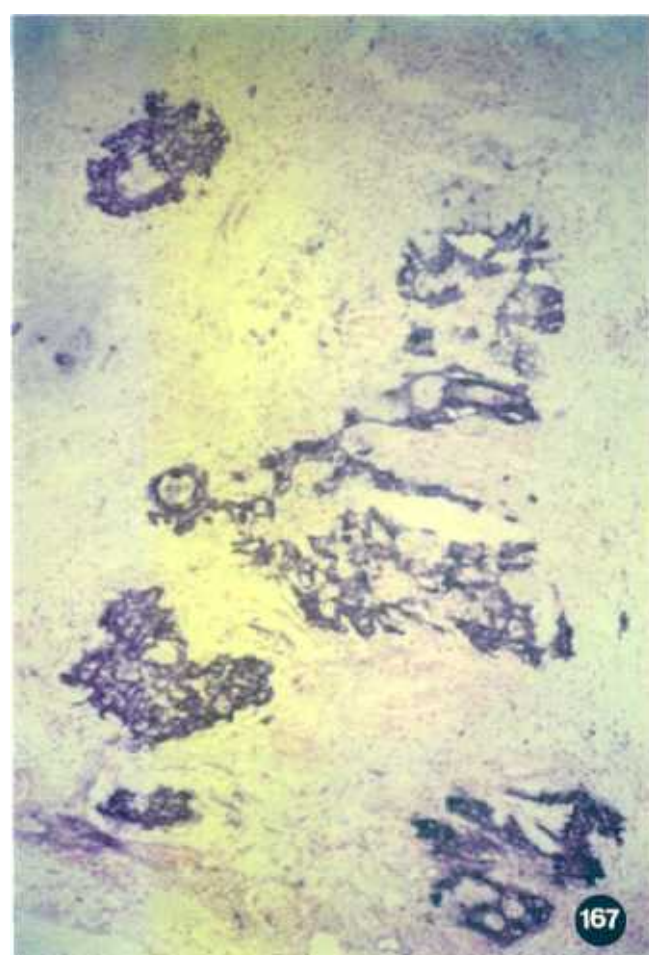
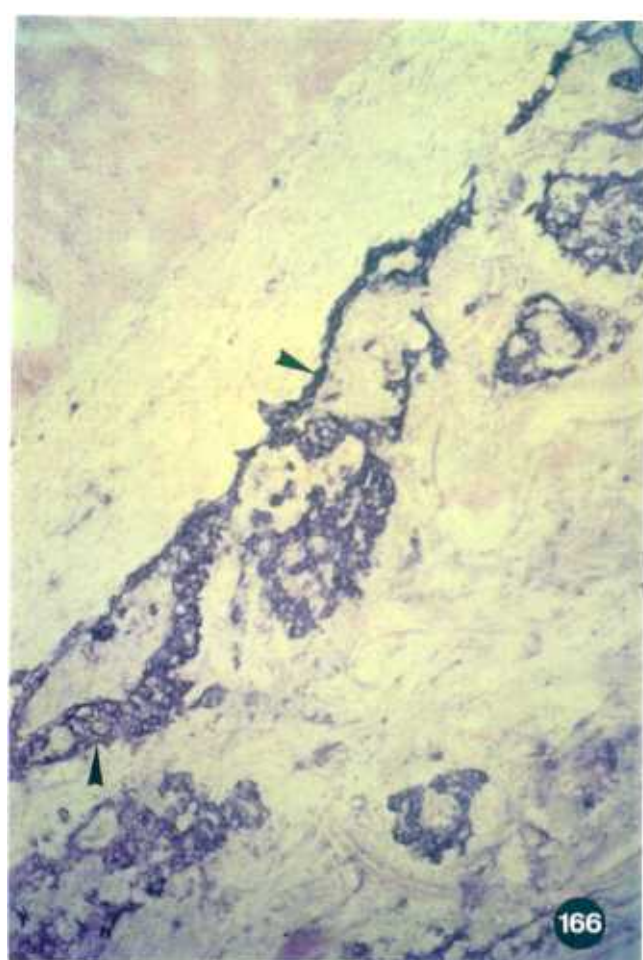
Figura 165. Bandas de células epiteliales detectadas con el anticuerpo anti-citoqueratina ( ◄ ). Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación singénica, 2 semanas después del trasplante. x125.

Figura 166. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación singénica, 2 semanas después del trasplante. Se observa que el anticuerpo F17-23-2 tiñe bandas de células ( ◄ ) con un patrón similar al previamente descrito para citoqueratina. x100.

Figura 167. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM, trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación singénica, 2 semanas después del trasplante. El patrón de tinción del anticuerpo F17-23-2 es similar al observado en la Fig. 166 para los fragmentos control. x100.

Figura 168. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Se observan células positivas para el anticuerpo His-39 ( ◄ ) formando grupos compactos. x100.





**Figura 169.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. El patrón de tinción es similar al descrito en la Fig. 168 para los fragmentos control. x100.

**Figura 170.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación singénica, 2 semanas después del trasplante. Al igual que lo visto para His-39, His-38 tiñe células que forman grupos compactos ( ► ), si bien, la intensidad de la tinción es mucho menor que para His-39. x100.

**Figura 171.** Células epiteliales citoqueratina+ ( ► ) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. Los linfocitos ( → ) empiezan a colonizar las bandas de células epiteliales que ya se observaban a las 2 semanas, y el patrón de tinción empieza a hacerse reticular en algunas zonas ( ■ ). x125.

**Figura 172.** Células epiteliales citoqueratina+ ( ► ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. El patrón reticular de la células epiteliales ( ■ ) es similar al observado en las ratas trasplantadas con fragmentos control (Fig. 171). x100.



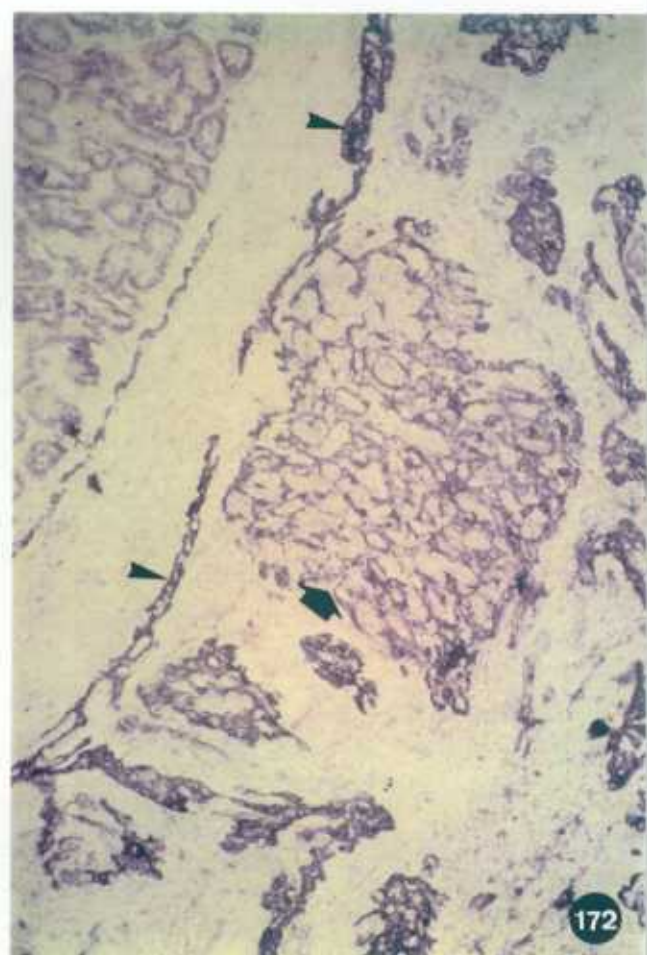
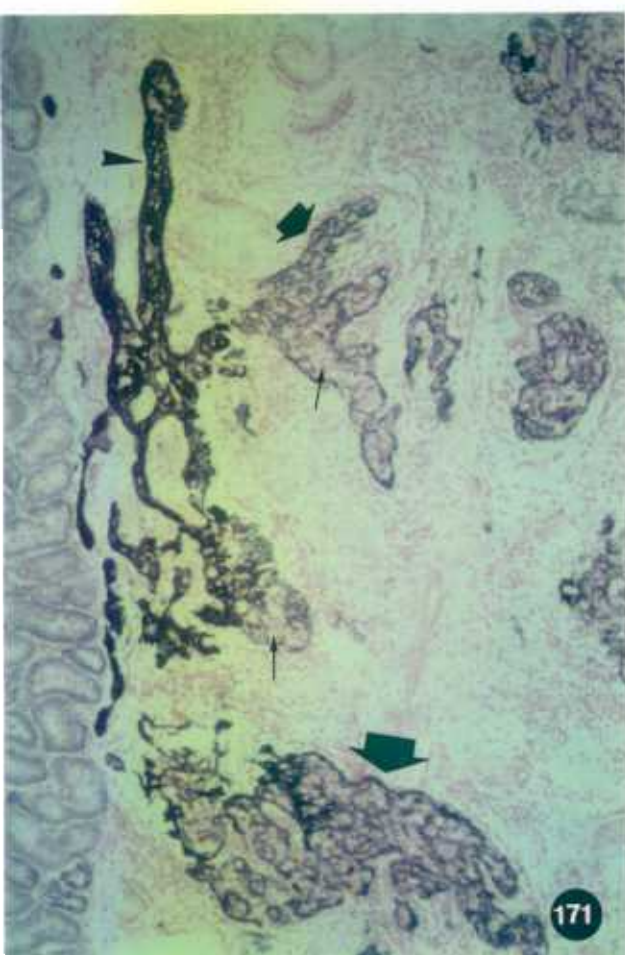
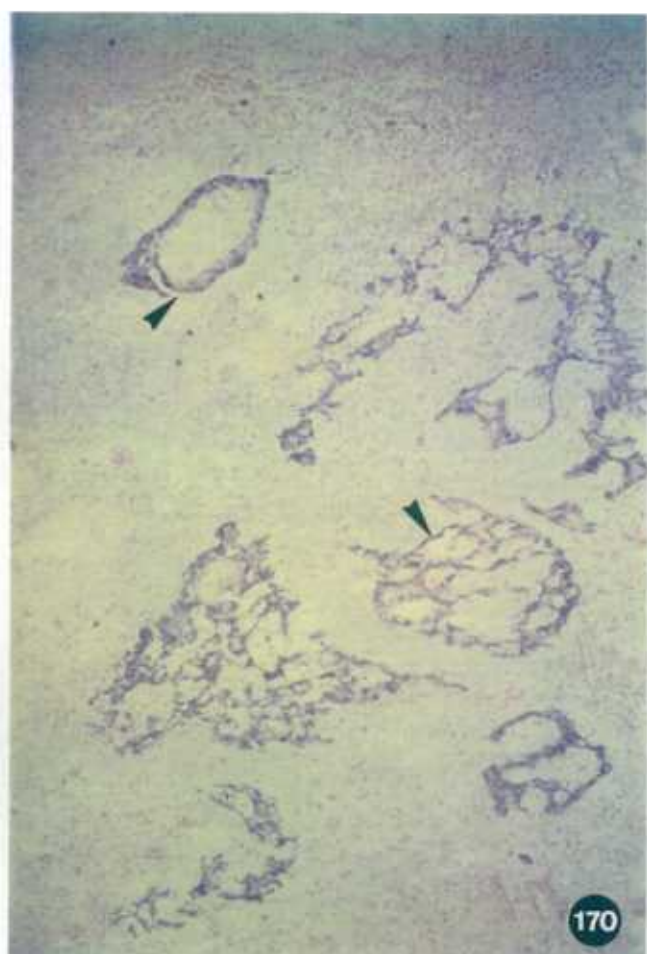
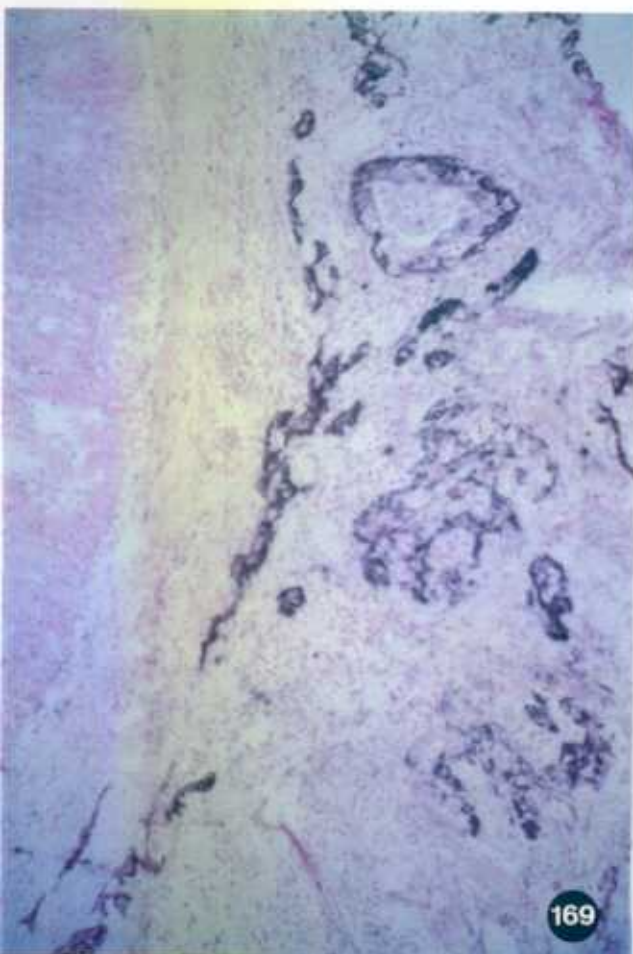


Figura 173. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. El patrón de tinción del anticuerpo F17-23-2, específico para moléculas del MHC del haplotipo donante es, como el de citoqueratina, reticular en las áreas ocupadas por células epiteliales (►). x100.

Figura 174. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. El patrón reticular de F17-23-2 (►) es similar que el descrito para el caso de los fragmentos control en la Fig. 173. x100.

Figura 175. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. De nuevo el patrón de tinción para F17-23-2 (►) es similar al descrito para los fragmentos control y tratados con dGuo 1,35mM. x100.

Figura 176. Células epiteliales citoqueratina+ (►) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación singénica, 6 semanas después del trasplante. El patrón de tinción reticular en corteza (C) y asociado con células irregulares grandes en médula (M) es similar al observado in situ en el timo. x100.



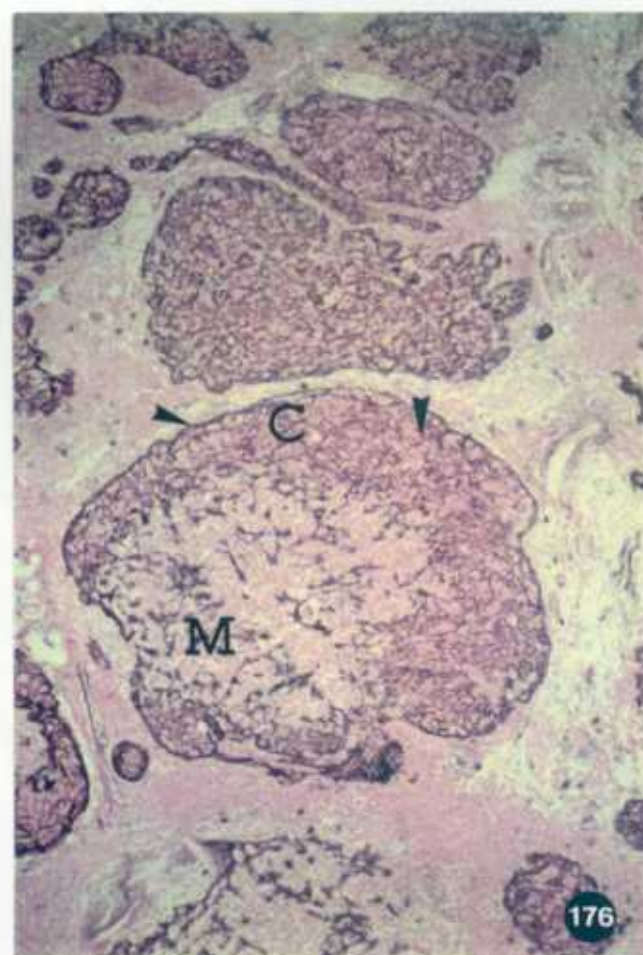
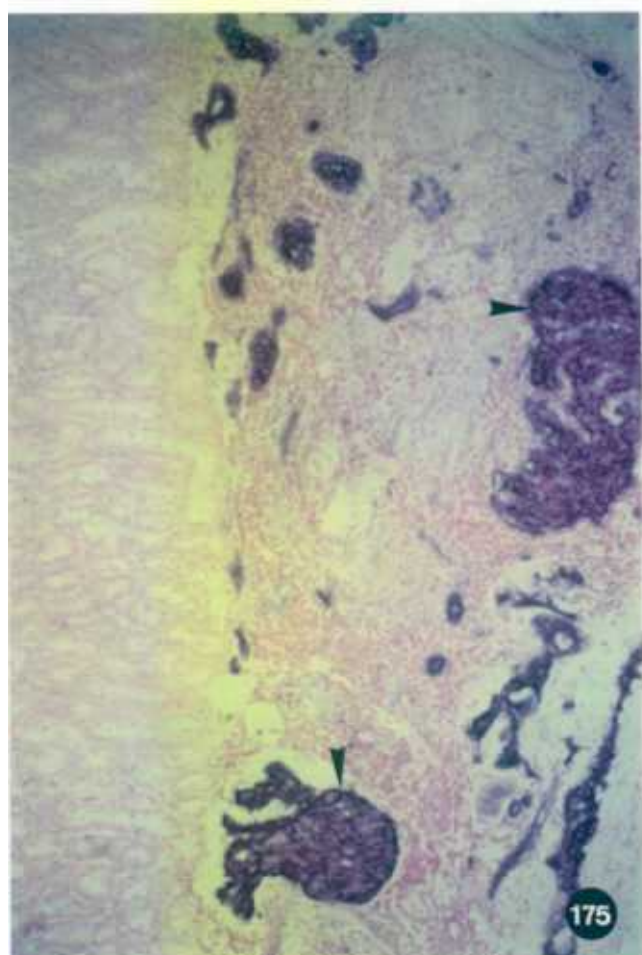
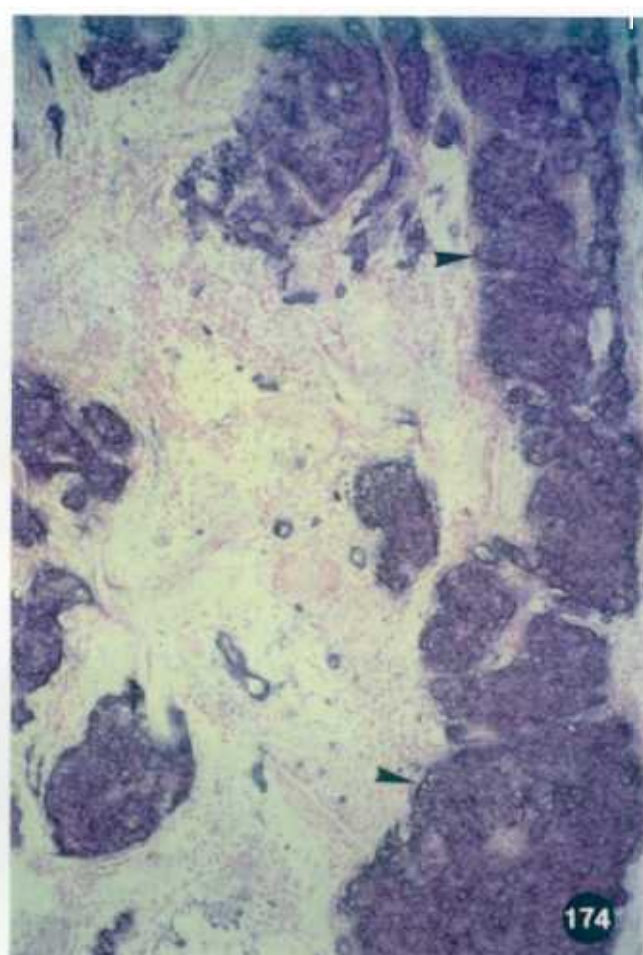
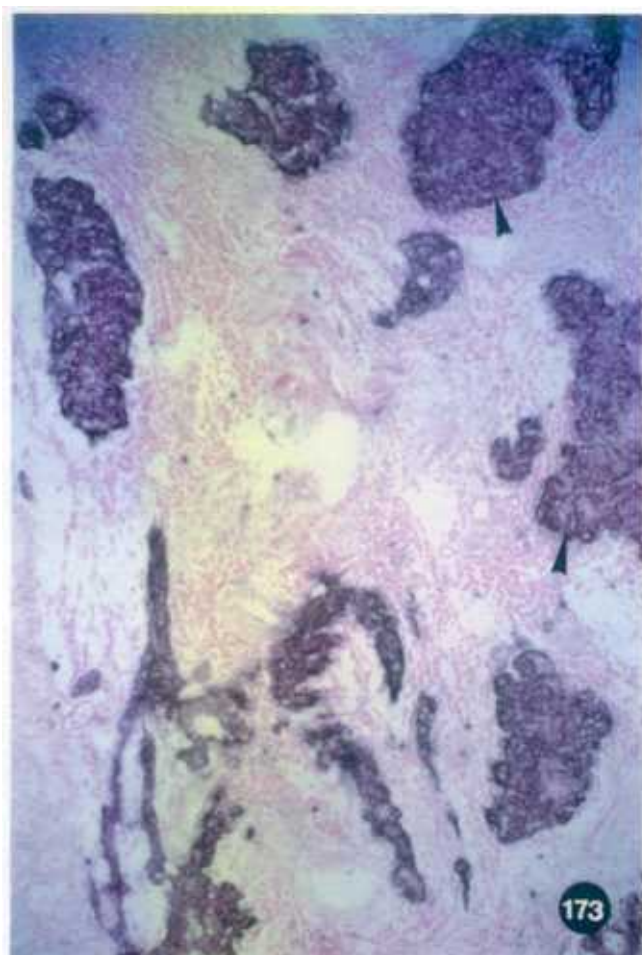


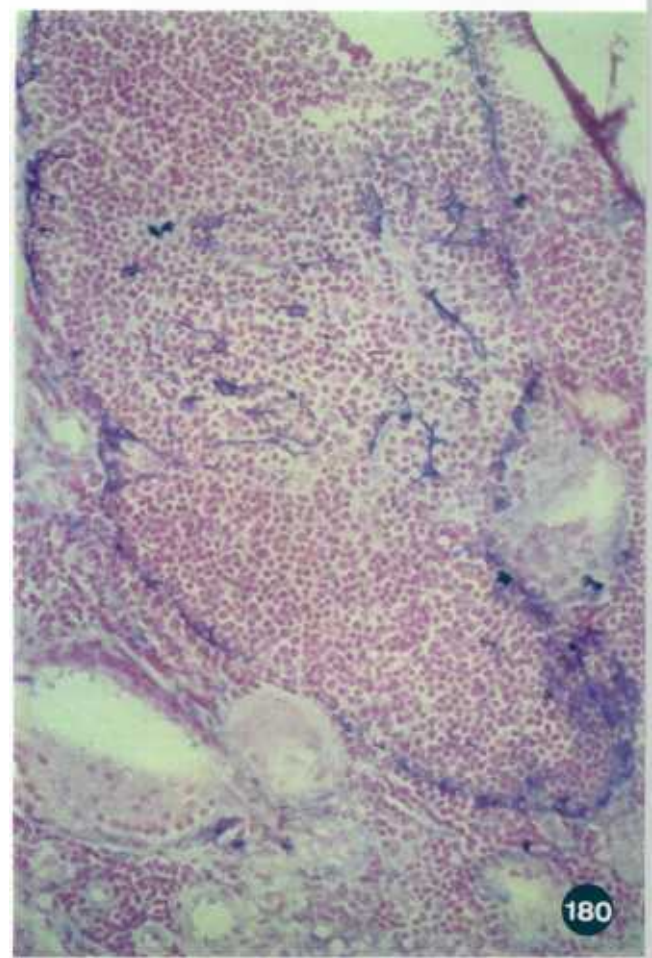
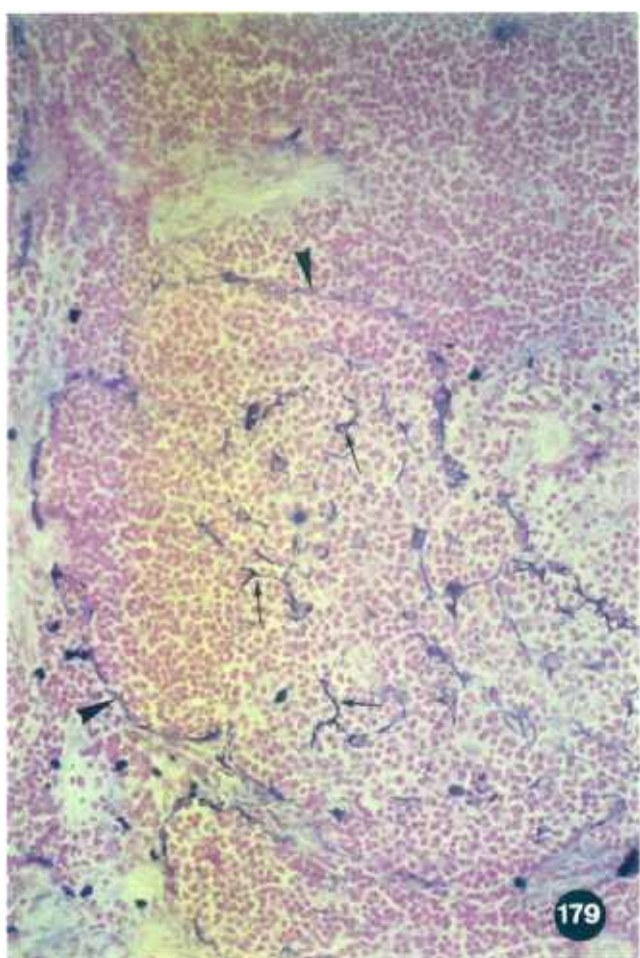
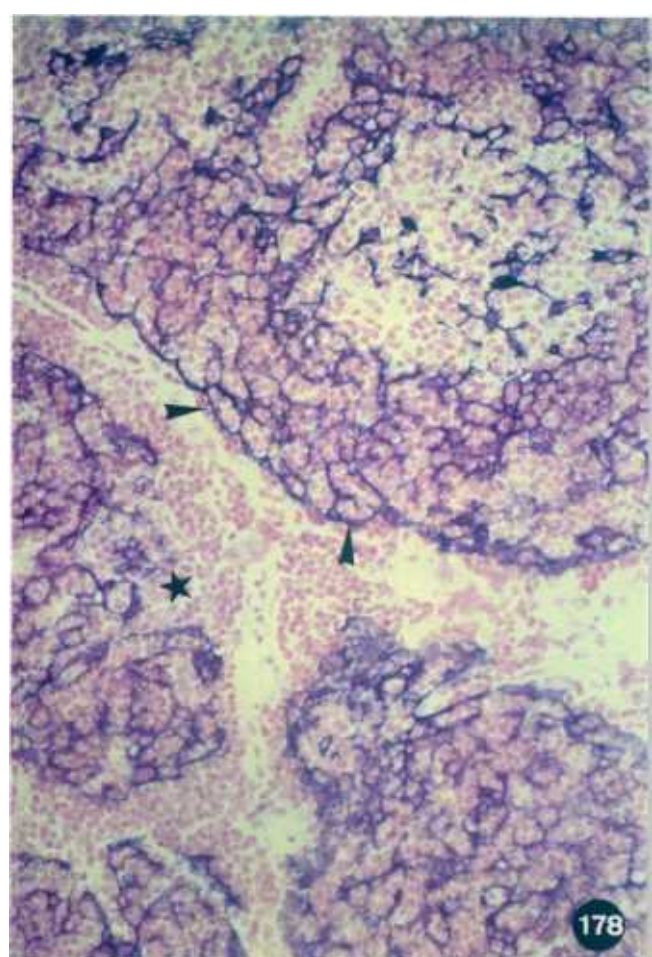
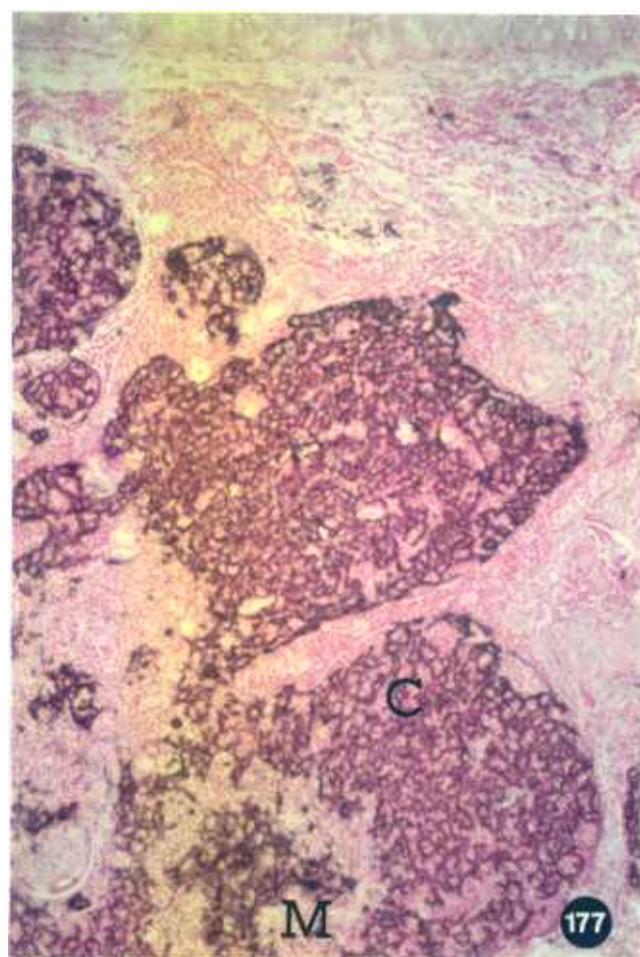
Figura 177. Expresión de moléculas del MHC de clase II del haplotipo donante (F17-23-2+) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación singénica, 6 semanas después del trasplante. El patrón es reticular en la corteza (C) y asociado a grandes células y grupos celulares en médula (M), como se describía en la Fig. 176 para la citoqueratina. x125.

Figura 178. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. Se observa que el patrón de tinción de las células epiteliales (citoqueratina+) en el límite del lóbulo ( ► ) varía respecto al encontrado en la zona subcapsular in situ. Incluso en algunas zonas el límite no es continuo ( ★ ). x400.

Figura 179. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. Se observa el patrón de tinción del anticuerpo His-39: células alargadas en el borde del lóbulo formando un límite casi continuo ( ► ) y células estrelladas con largas prolongaciones en las zonas interiores del lóbulo ( ← ). x400.

Figura 180. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica 6 semanas después del trasplante. El patrón de tinción de His-39 es similar al descrito para los fragmentos control. x400.





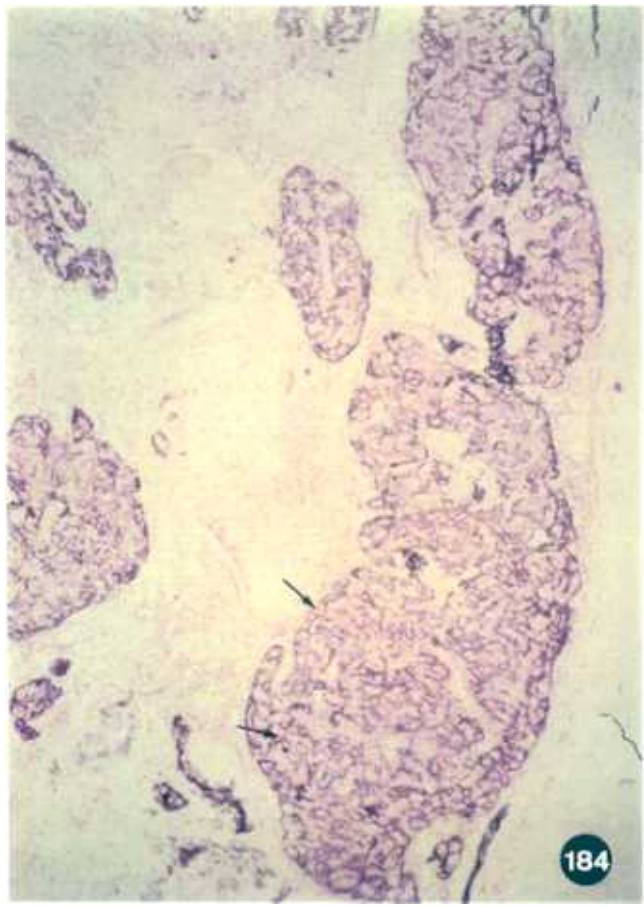
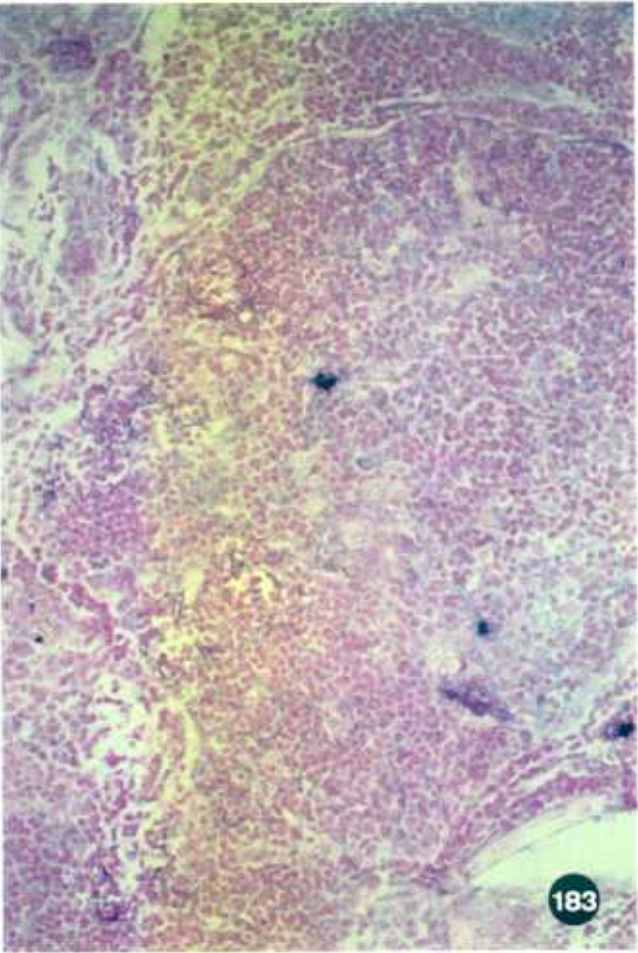
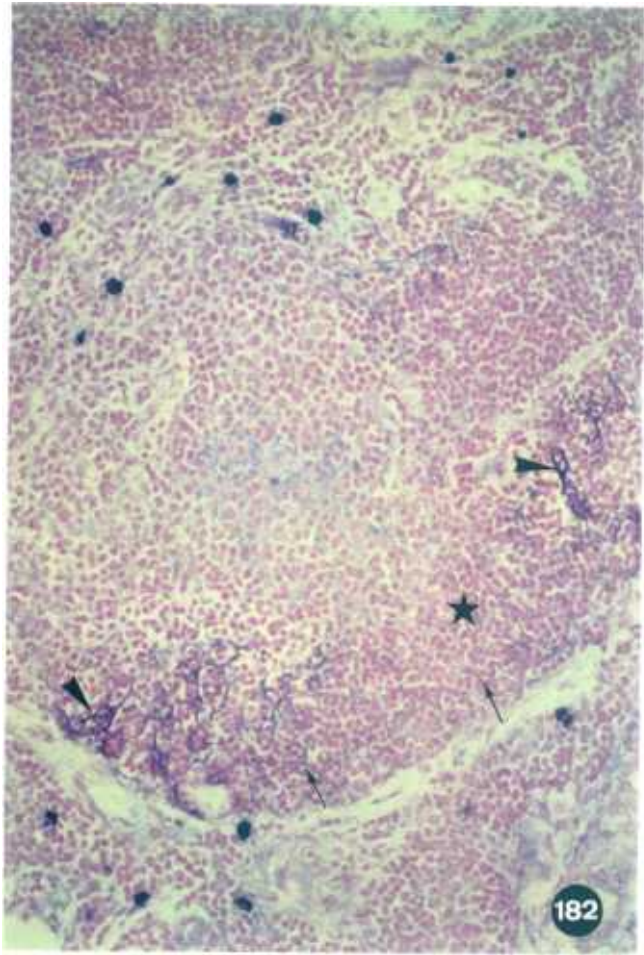
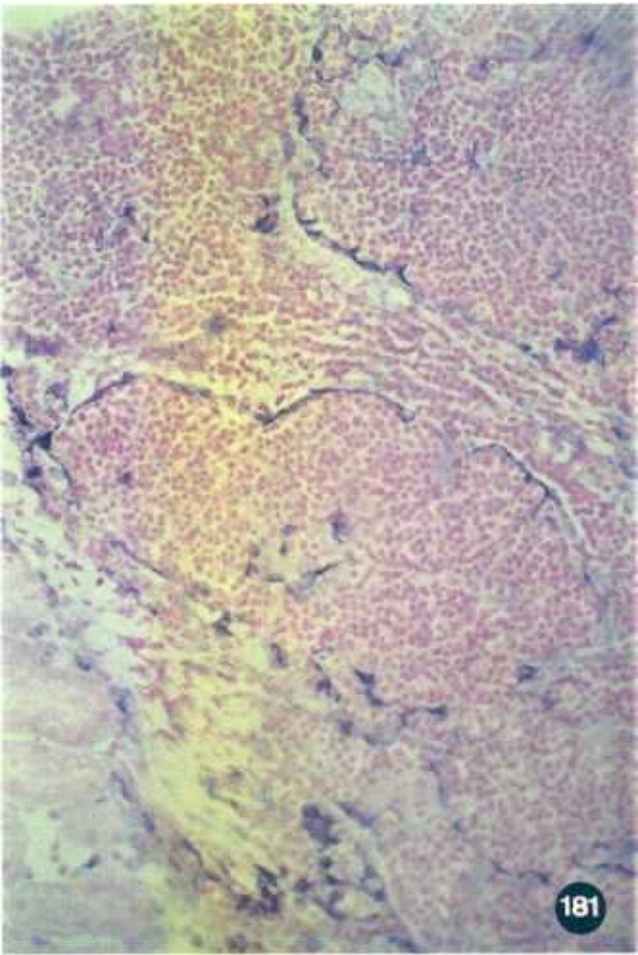
**Figura 181.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica 6 semanas después del trasplante. El patrón de tinción de His-39 es similar al visto para los fragmentos control y los tratados con dGuo. x400.

**Figura 182.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. His-38 tiñe células en la corteza de los lóbulos con un patrón reticular tanto con una intensidad alta (►) como con baja intensidad (→). Hay zonas, sin embargo, donde, al contrario de la situación in situ, no existe tinción (★). x400.

**Figura 183.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. El patrón de tinción de His-38 es similar al descrito para los fragmentos control en la Fig. 182 x400.

**Figura 184.** Células epiteliales citoqueratina+ ( → ) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. x100.





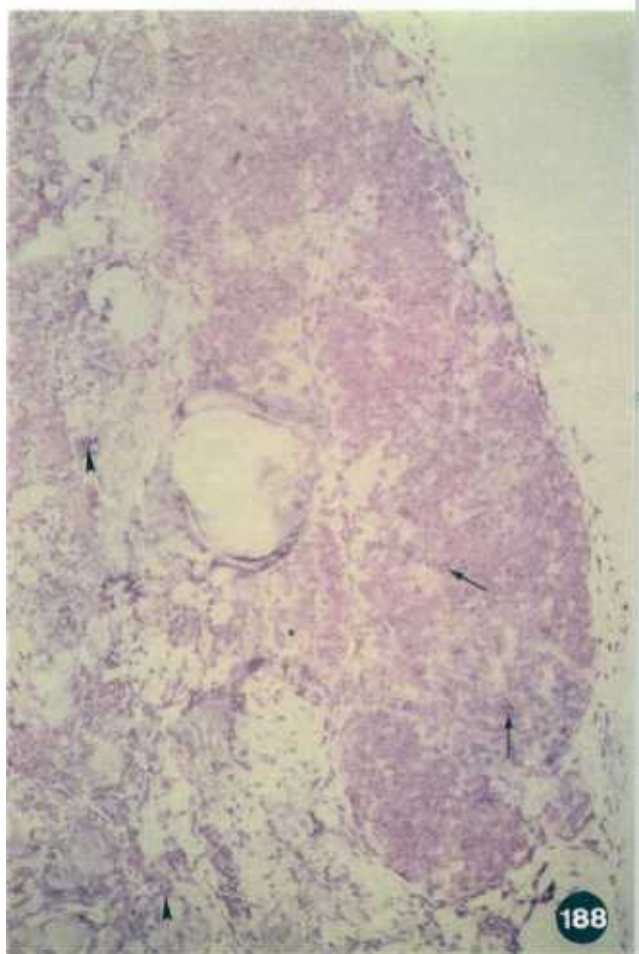
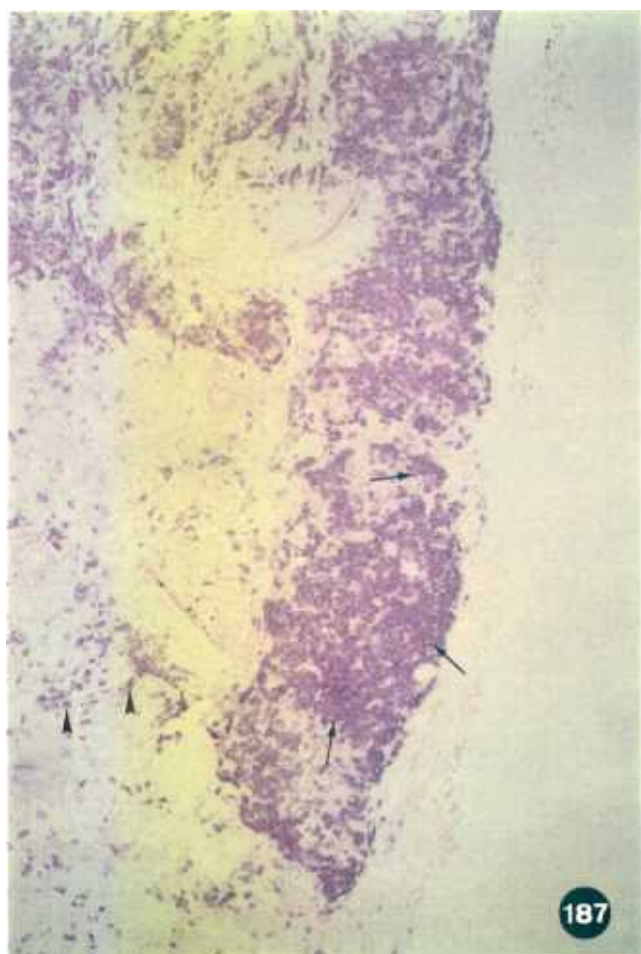
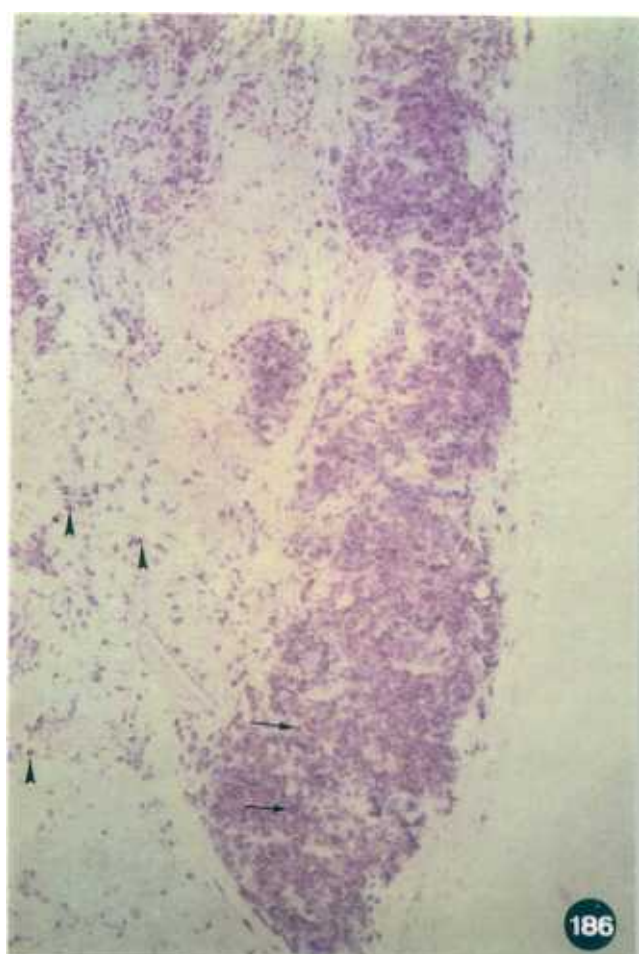
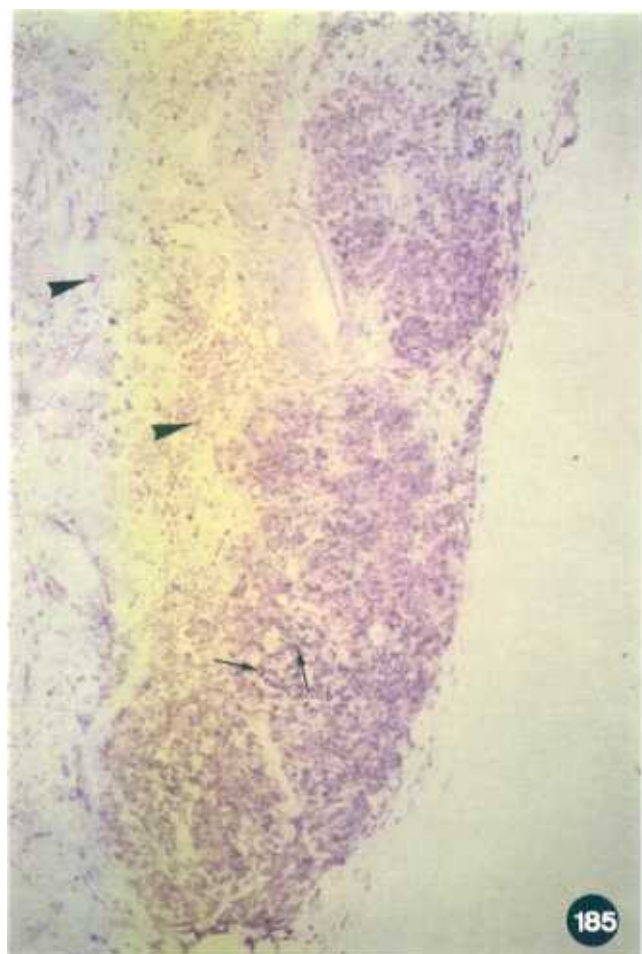
**Figura 185.** Linfocitos CD5+ (células OX-19+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. Las células positivas, que presentan una intensidad de tinción variable, se disponen básicamente en el área ocupada por las células epiteliales ( → ) (ver Fig. 184) pero también en el conectivo ( ► ). x100.

**Figura 186.** Linfocitos TcR  $\alpha\beta$ + (células R73+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. También en este caso las células positivas, que presentan una intensidad de tinción variable, se disponen en las áreas ocupadas por epitelio ( → ) con algunos elementos dispersos en el tejido conectivo ( ► ). x100.

**Figura 187.** Linfocitos CD8+ (células OX-8+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. Las células positivas, que presentan una intensidad de tinción variable, se disponen en las áreas ocupadas por epitelio ( → ) con algunos elementos dispersos en el tejido conectivo ( ► ). x100.

**Figura 188.** Linfocitos CD4+ (células ER-2+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 4 semanas después del trasplante. Al igual que en las Figs. 185, 186, 187, las células positivas, que presentan una intensidad de tinción variable, se disponen en las áreas ocupadas por epitelio ( → ) y en el tejido conectivo ( ► ). x100.





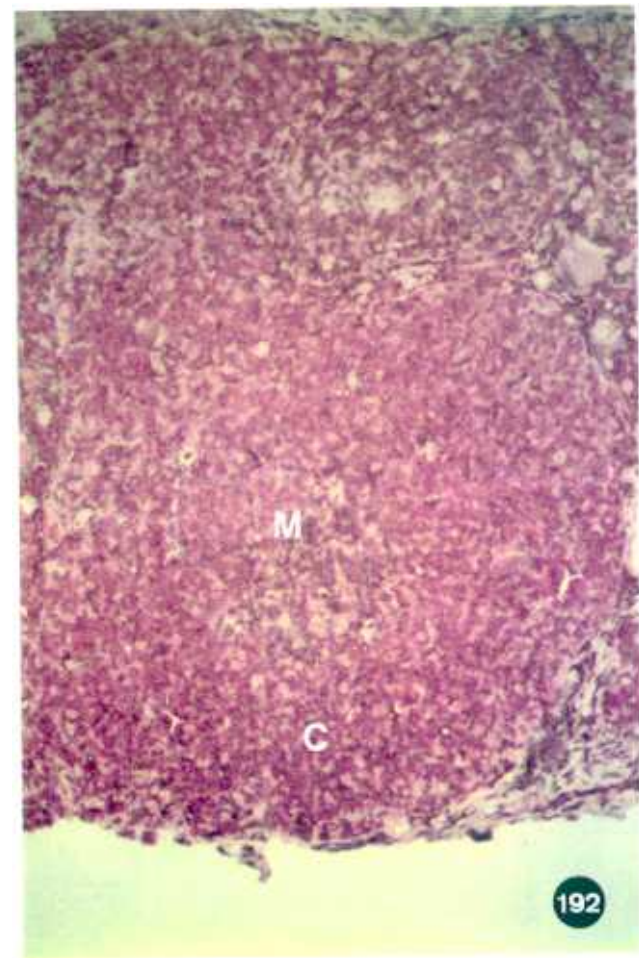
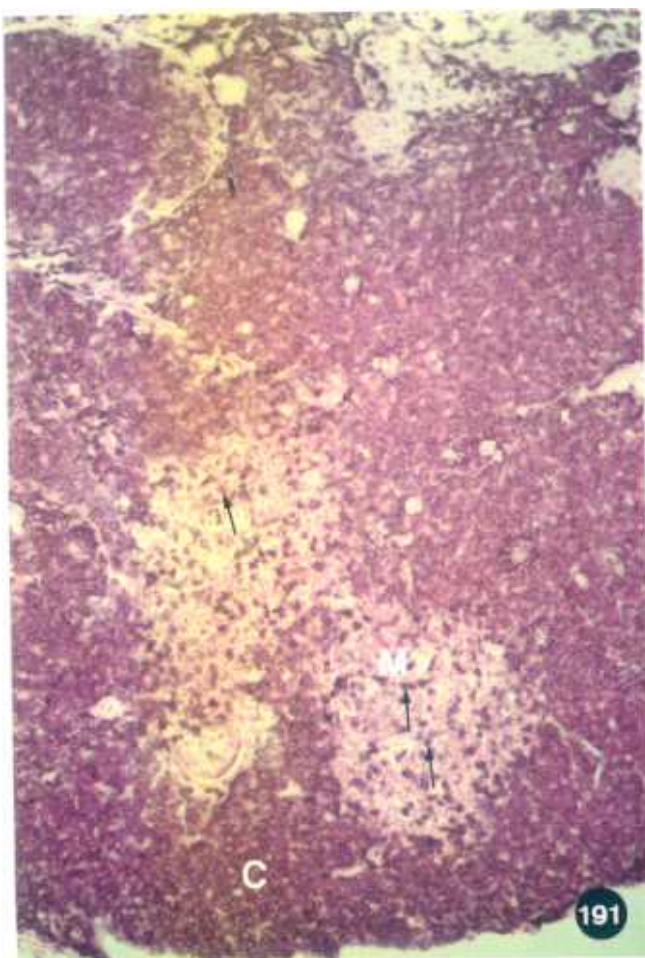
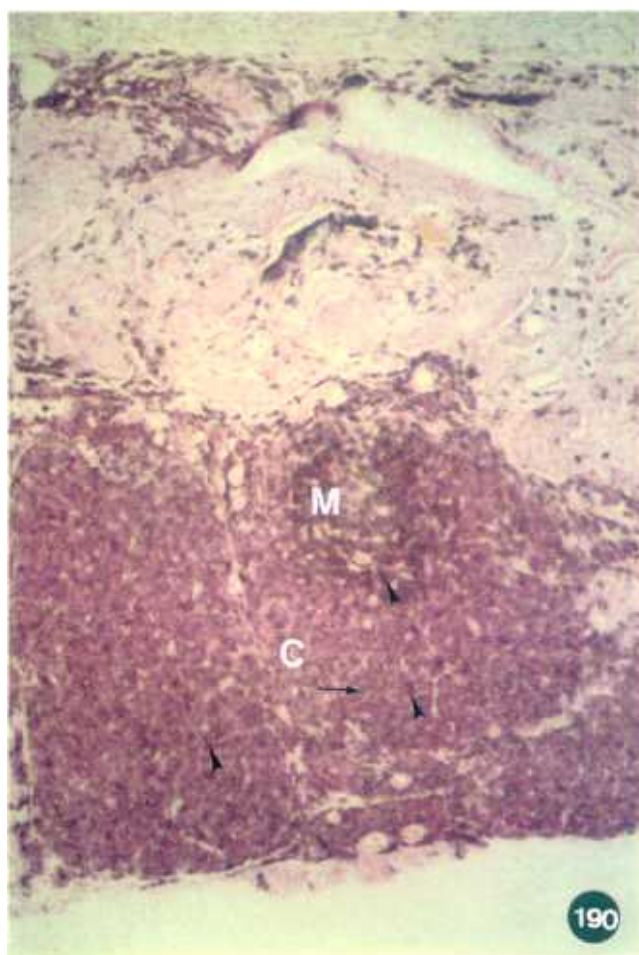
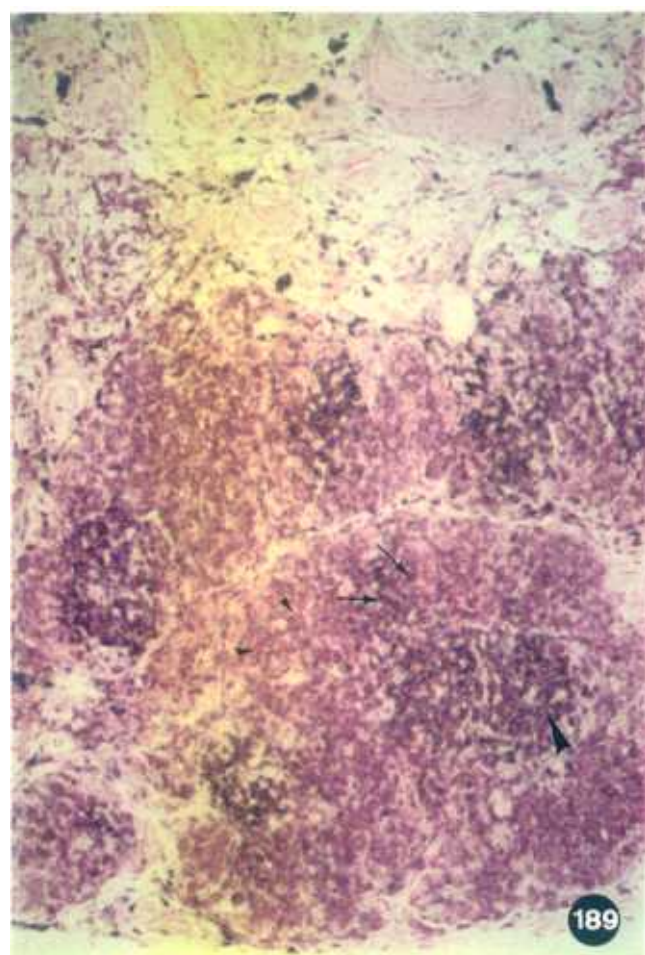
**Figura 189.** Células CD5+ (células OX-19+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. Se puede observar el predominio de células fuertemente positivas para este marcador en zonas medulares ( ► ), aunque también las hay dispersas en corteza ( → ), estando la mayoría de las presentes en áreas corticales débilmente teñidas ( ◄ ). x125.

**Figura 190.** Células TcR  $\alpha\beta$ + (células R73+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. Las células fuertemente positivas ( ► ) para este marcador se encuentran dispersas en corteza (C) y, sobre todo, en médula (M). Las débilmente positivas están en corteza ( → ). x125.

**Figura 191.** Células CD8+ (OX-8) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. La práctica totalidad de los linfocitos en corteza (C) son positivos para este marcador y sólo algunos ( → ) lo son en áreas medulares (M). x125.

**Figura 192.** Células CD4+ (células ER-2+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. La mayoría de los linfocitos en corteza son positivos para este marcador y, en médula, hay grupos de células positivas no siendo la tinción exclusiva de linfocitos. C, corteza; M, médula. Nótese que el patrón de tinción de los marcadores linfoides en las Figs. 189, 190, 191, 192 es igual al observado in situ en el timo. x125.





**Figura 193.** Macrófagos ED2+ en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Las células positivas aparecen en el tejido conectivo rodeando (◄), pero no dentro de, las bandas de células epiteliales (Ep). x200.

**Figura 194.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. El patrón de distribución del anticuerpo ED1 es similar al encontrado en timo de ratas normales: hay células positivas (►) dispersas tanto en la corteza (C) como en la médula (M). x200.

**Figura 195.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días con 1,35mM de dGuo trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. Al igual que en los fragmentos control, los fragmentos tratados con dGuo presentan macrófagos ED1+ con igual distribución que en el timo normal. C, corteza; M, médula. x200.

**Figura 196.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días con CsA 3,0µg/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. El patrón encontrado para los macrófagos ED1+ es igual al de los fragmentos control y tratados con dGuo. C, corteza; M, médula. x200.



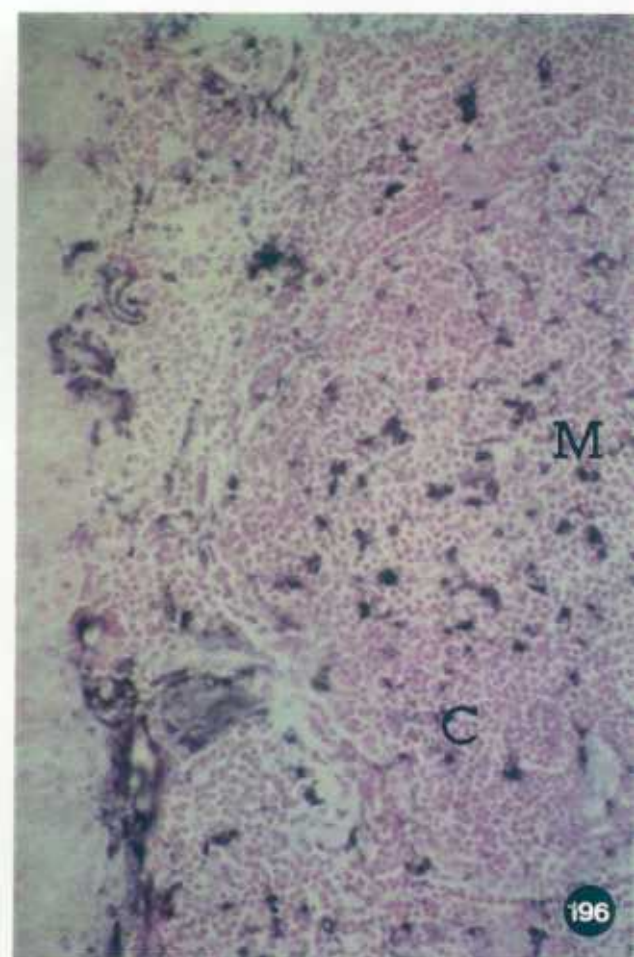
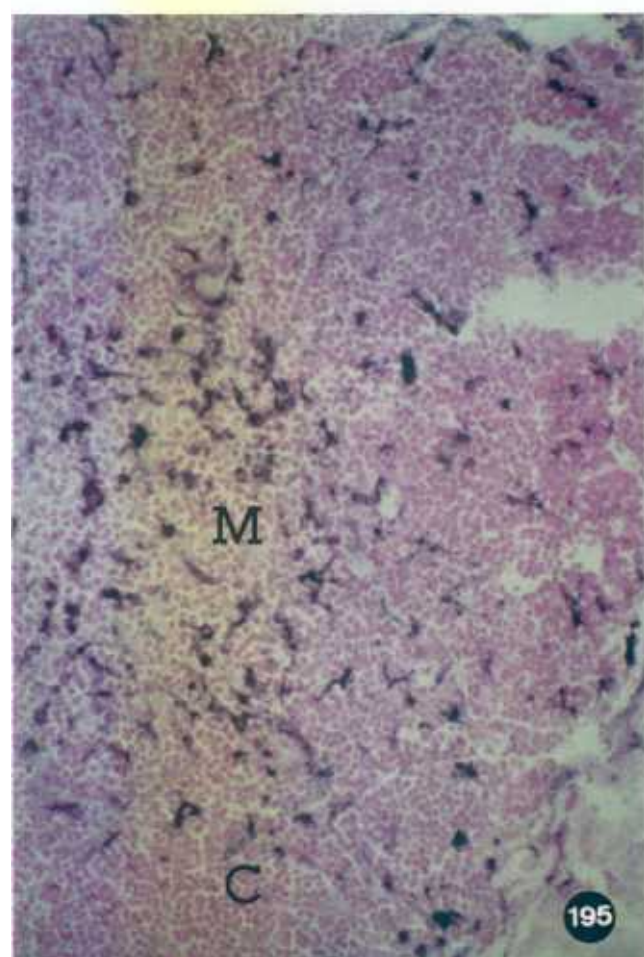
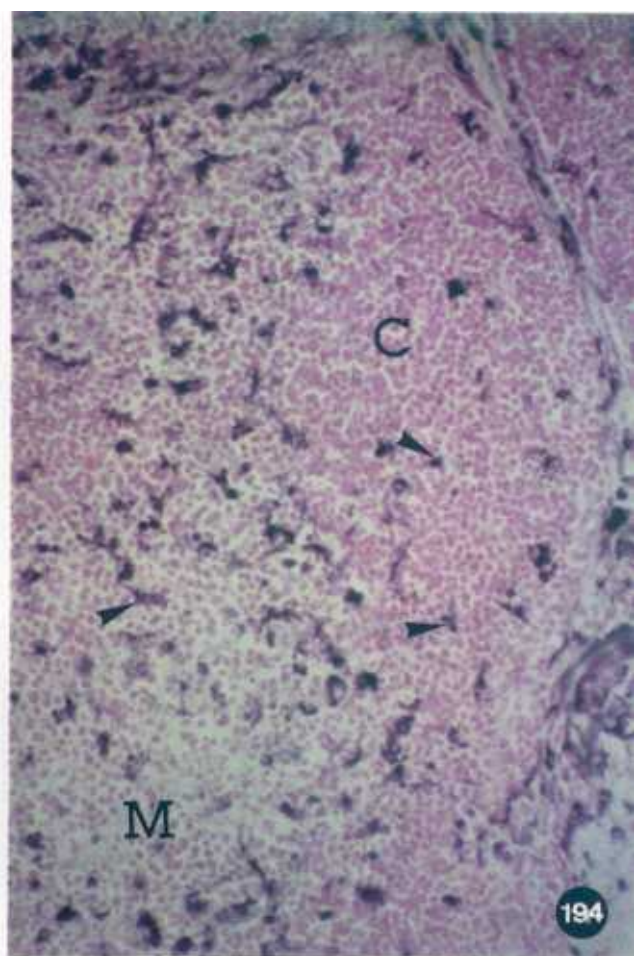
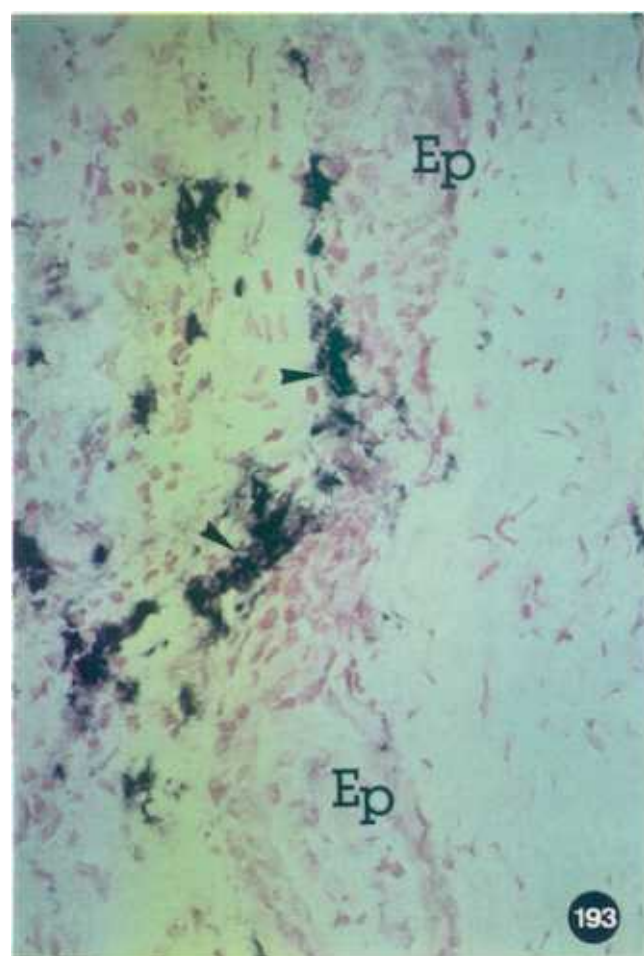




Figura 197. Macrófagos ED2+ en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. El patrón de tinción, células positivas ( ► ) dispersas en corteza (C) y negativas en médula (M), es igual al que se observa in situ en un timo normal. x125.

Figura 198. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Se observan células que expresan moléculas del MHC de clase II del haplotipo del huésped (OX-3+) tanto fuera ( ► ) como dentro ( → ) de las bandas de células epiteliales ( ★ ). x200.

Figura 199. Expresión de moléculas del MHC de clase II del haplotipo del huésped (OX-3+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación singénica, 6 semanas después del trasplante. El patrón en áreas medulares es igual al observado in situ para este marcador en el timo. Por el contrario, el patrón en áreas de corteza ( ↑ ) parece asociado a elementos dispersos no epiteliales. C, corteza; M, médula. x125.

Figura 200. Expresión de moléculas del MHC de clase I del haplotipo del huésped (U9-F4-B1+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Todas las células presentes en el trasplante, excepto las bandas de células epiteliales ( ← ), son positivas para este marcador. Algunas células dispersas entre estas bandas ( → ) también expresan este marcador. x200.

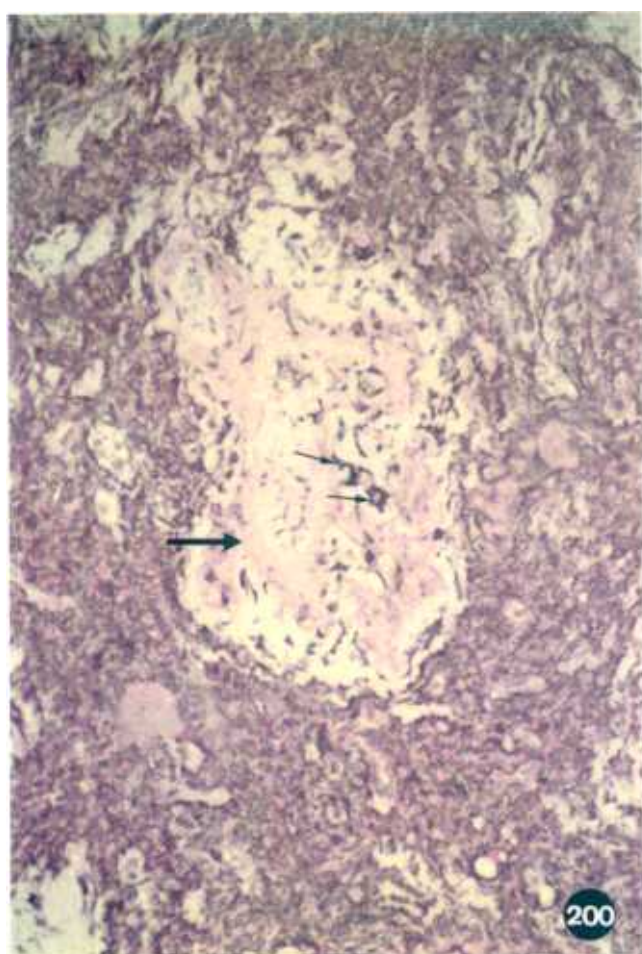
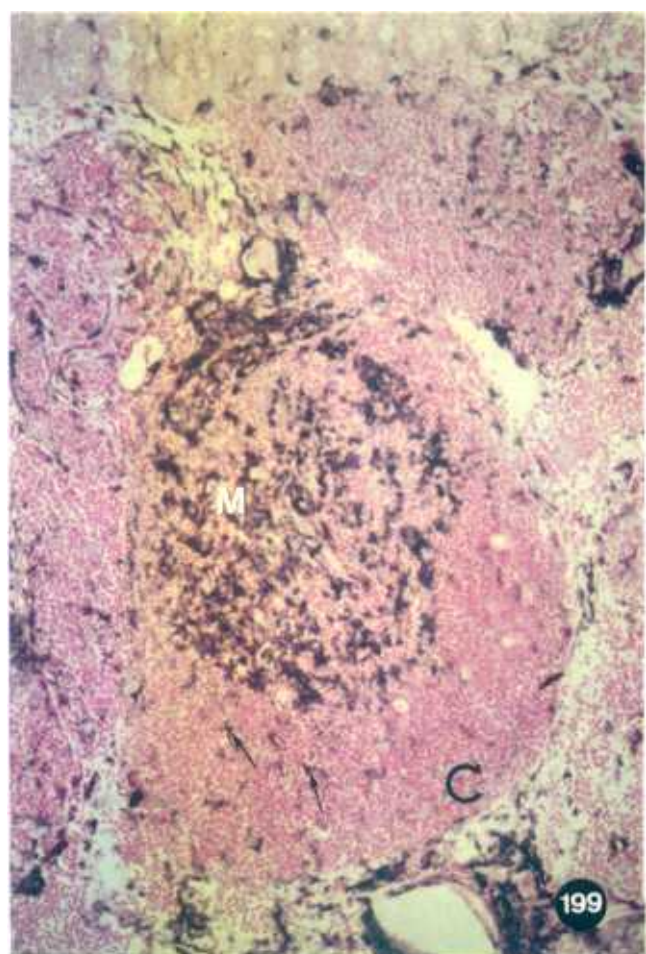
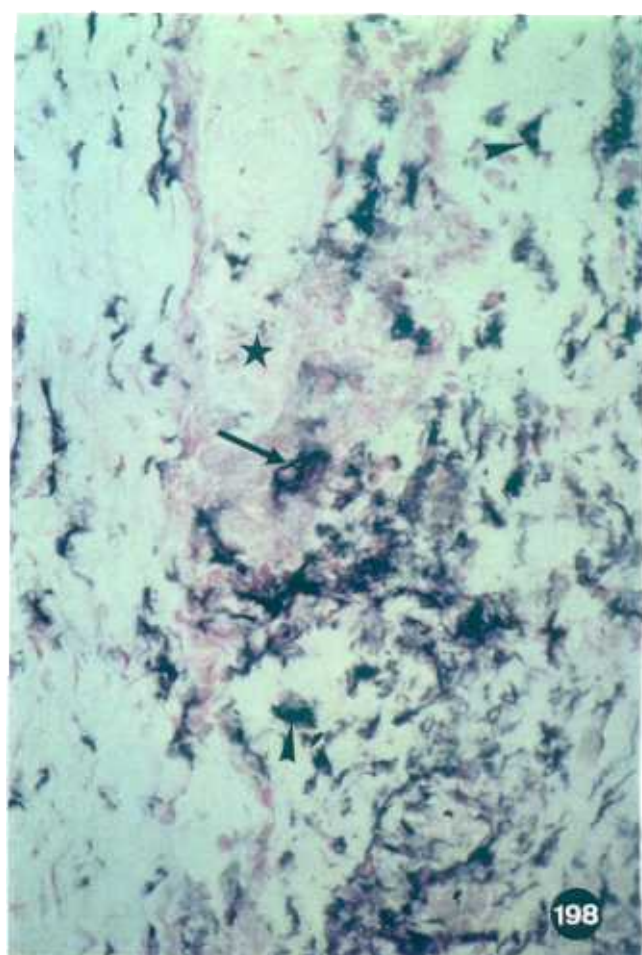
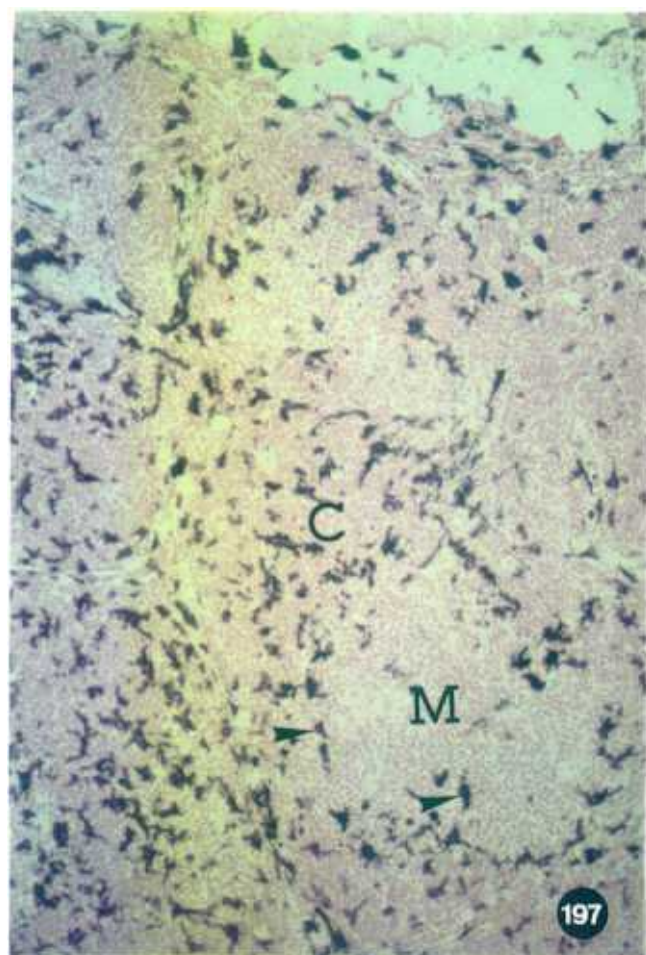


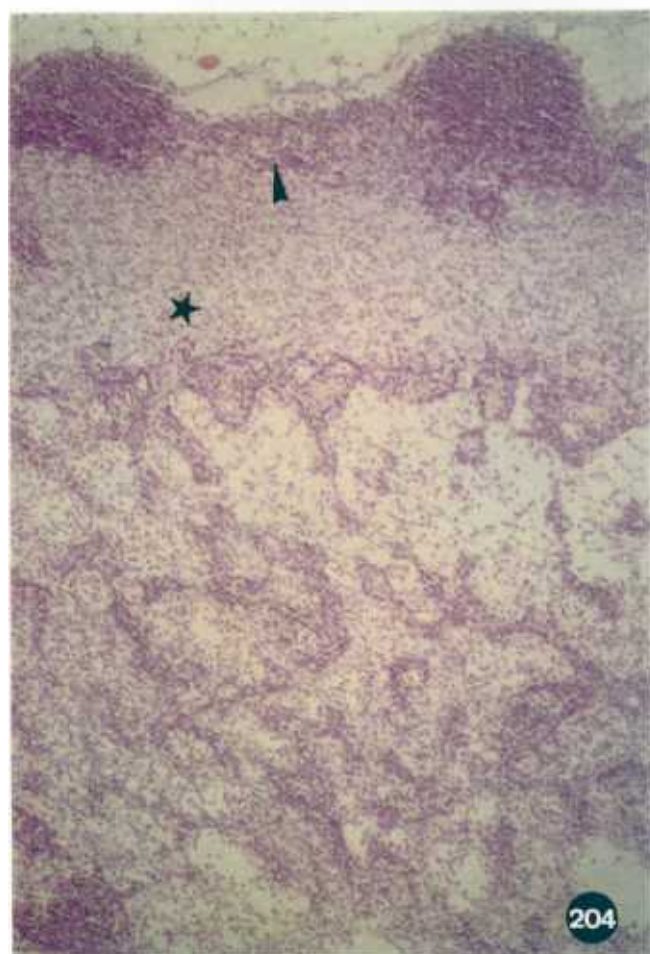
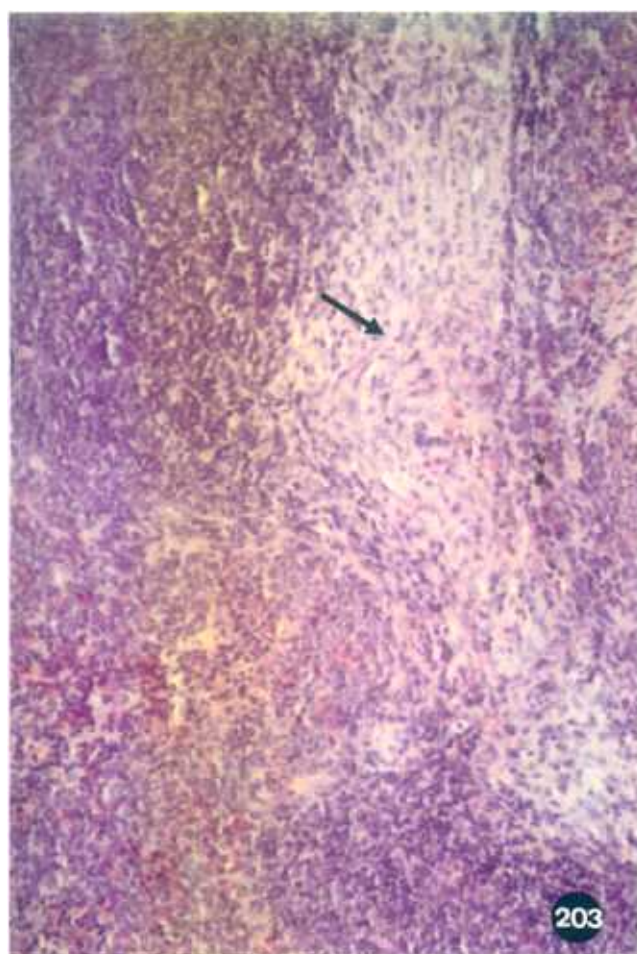
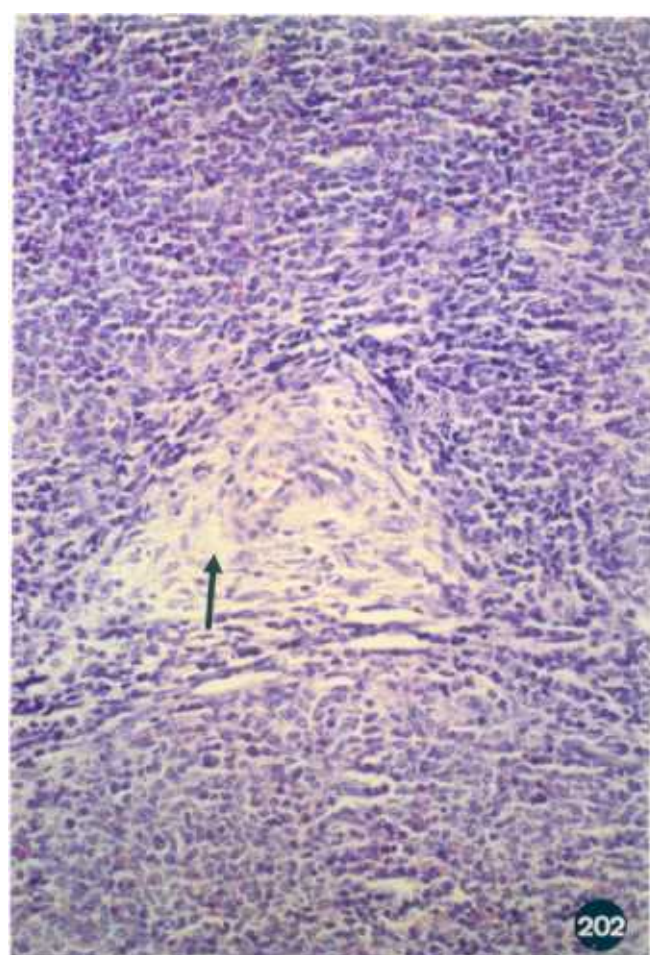
Figura 201. Expresión de moléculas del MHC de clase I (determinate monomórfico, células OX-18+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata "nude", en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Todas las células del trasplante, incluyendo las células epiteliales ( → ) trasplantadas, expresan este marcador. x200.

Figura 202. Bazo de una rata "nude" trasplantada con fragmentos de timo cultivados en suspensión durante 8 días tratados con dGuo 1,35mM, en combinación singénica, 2 semanas después del trasplante. Las vainas linfoides periarteriolas (PALS) están vacías de células linfoides ( ← ). x200.

Figura 203. Bazo de una rata "nude" trasplantada con fragmentos de timo cultivados en suspensión durante 8 días en medio control, en combinación singénica, 4 semanas después del trasplante. Las PALS ( → ) permanecen vacías. x200.

Figura 204. Ganglio linfático mesentérico de una rata "nude" trasplantada con fragmentos de timo cultivados en suspensión durante 8 días tratados con CsA 3,0µg/ml, en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Se observa que tanto el paracórtex ( ★ ) como las zonas interfoliculares ( ► ) están vacías de células linfoides. x100.





**Figura 205.** Ganglio linfático mesentérico de una rata "nude" trasplantada con fragmentos de timo cultivados en suspensión durante 8 días tratados con CsA  $3,0\mu\text{g/ml}$ , en combinación singénica, 4 semanas después del trasplante. Las áreas T dependientes muestran la ausencia de células linfoides ( ► ). x100.

**Figura 206.** Bazo de una rata "nude" trasplantada con fragmentos de timo cultivados en suspensión durante 8 días tratados con CsA  $3,0\mu\text{g/ml}$ , en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. Se pueden observar algunos linfocitos ( ► ) en las PALS. x200.

**Figura 207.** Ganglio linfático de una rata "nude" trasplantada con fragmentos de timo cultivados en suspensión durante 8 días tratados con CsA  $3,0\mu\text{g/ml}$ , en combinación alogénica, 6 semanas después del trasplante. Se observa una cierta recuperación linfoide en las áreas T dependientes, paracórtex ( ★ ) y zonas interfoliculares ( ◄ ). x100.

**Figura 208.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo  $1,35\text{mM}$  trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación singénica, 1 semana después del trasplante. Se observa la masiva infiltración linfoide del tejido trasplantado. También se observan grupos compactos de células epiteliales ( ► ). R, túbulos renales. x100.



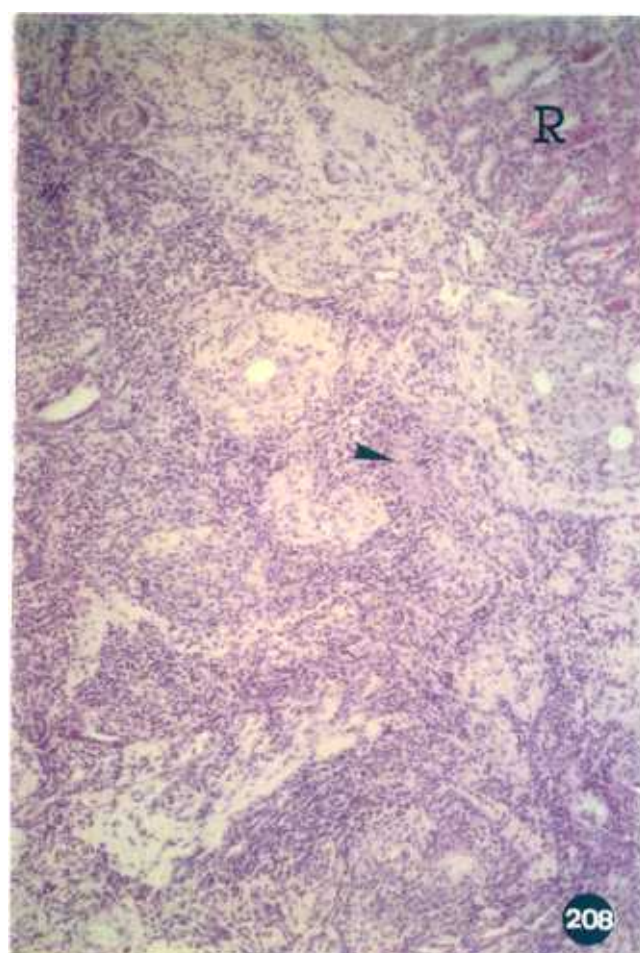
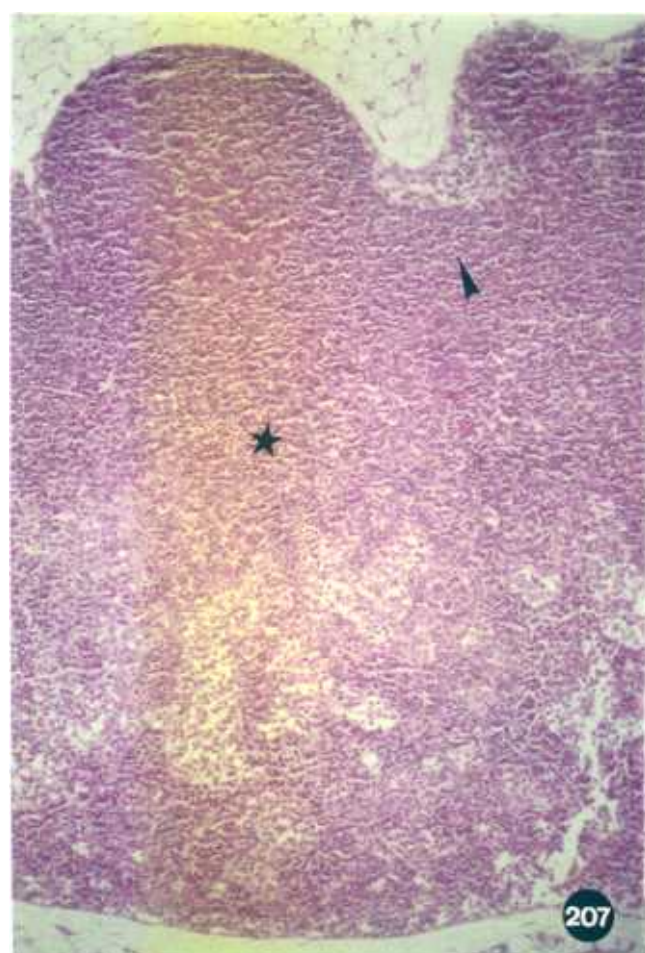
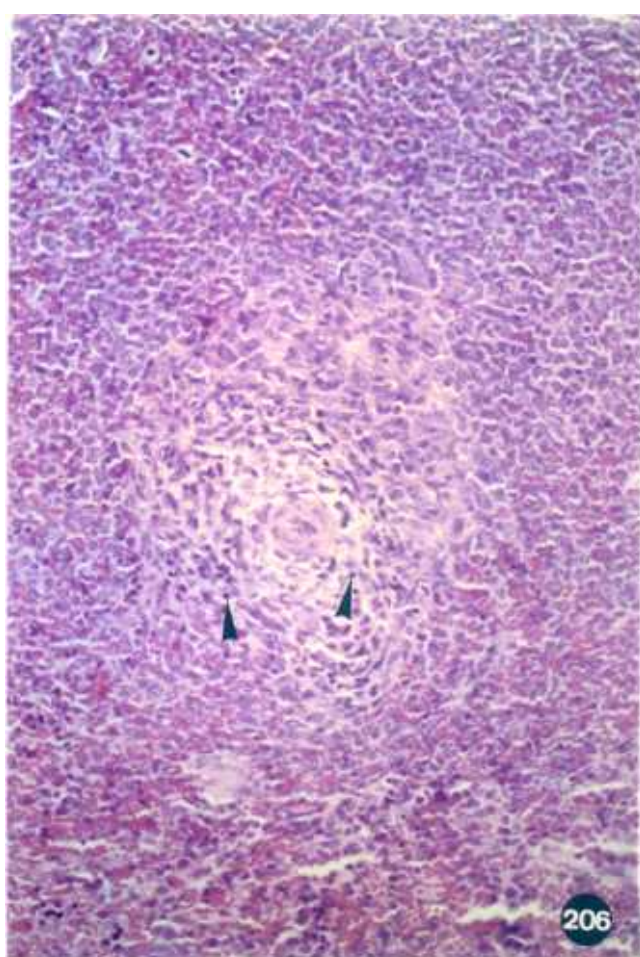
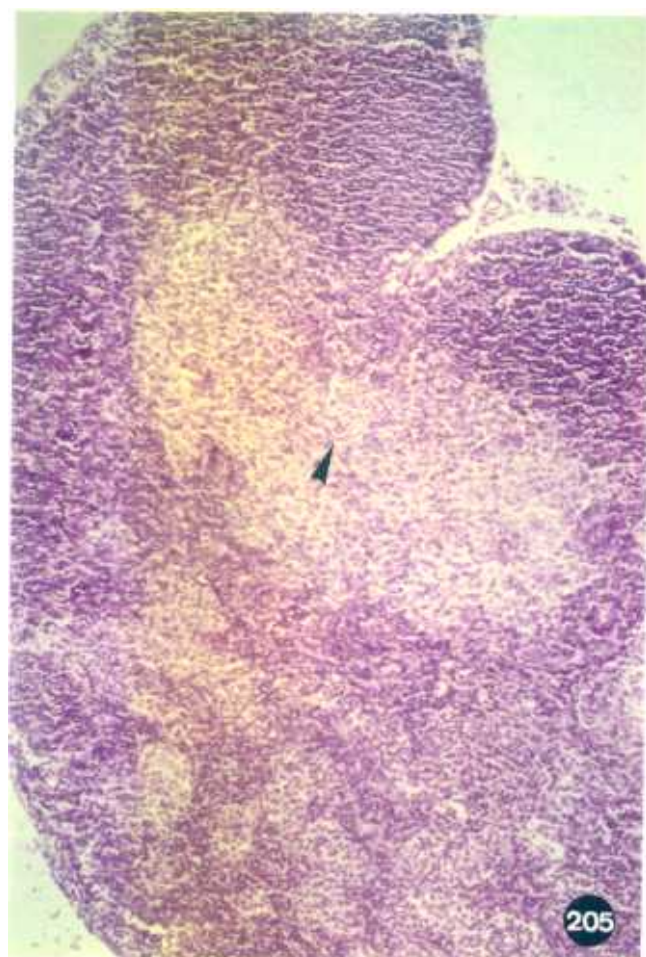


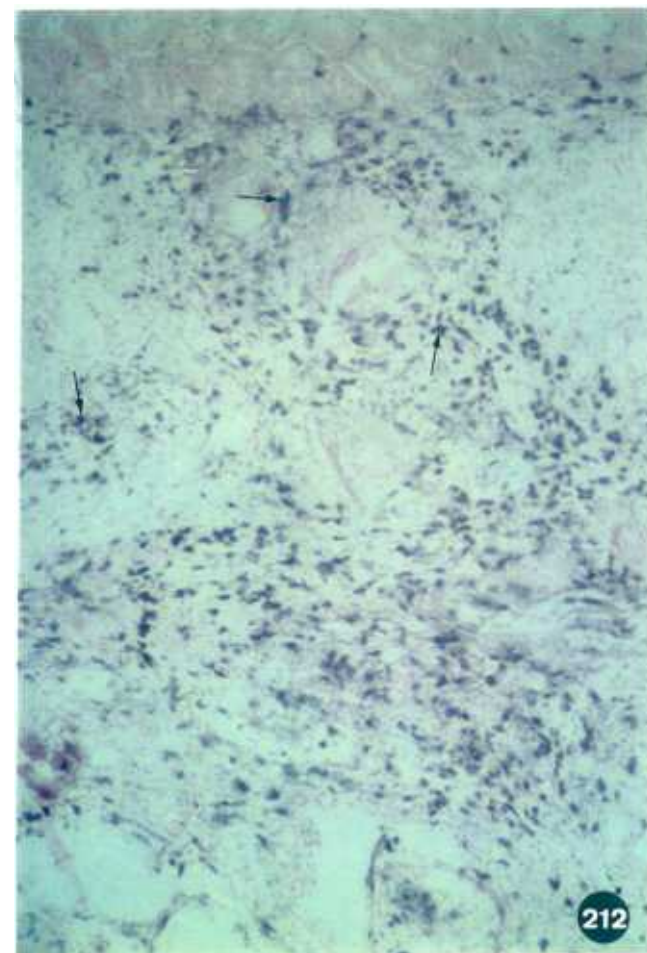
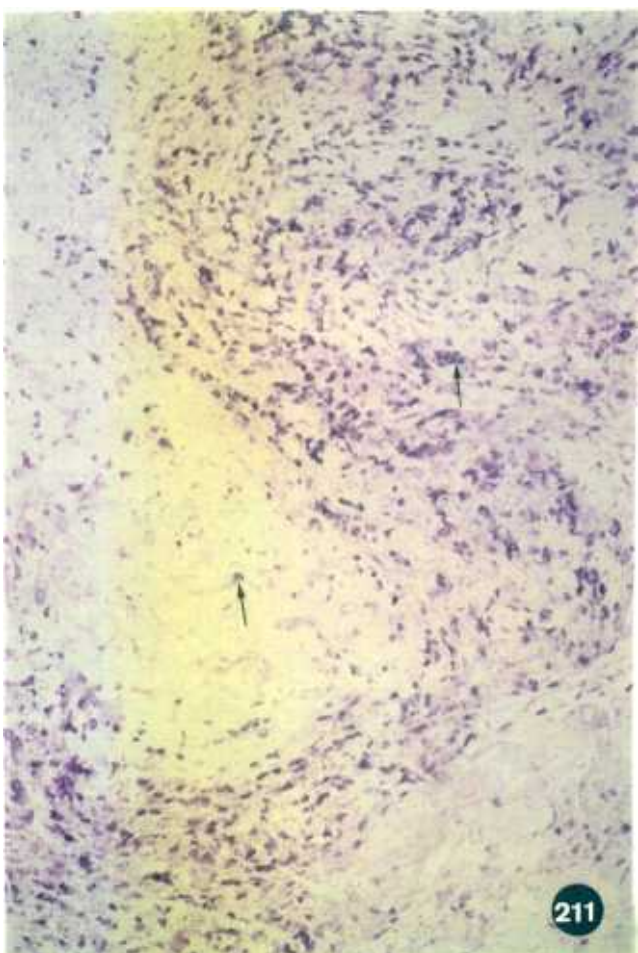
Figura 209. Células epiteliales citoqueratina+ ( ► ) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación singénica, 1 semana después del trasplante. Se aprecia la presencia de algunos linfocitos dentro de las bandas de células epiteliales ( ← ). x100.

Figura 210. Células epiteliales citoqueratina+ ( ► ) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0 µg/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación singénica, 1 semana después del trasplante. Al igual que en el caso de los fragmentos control de la Fig. 209, se aprecia la presencia de algunos linfocitos dentro de las bandas de células epiteliales ( ← ). x100.

Figura 211. Células CD5+ (OX-19+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación singénica, 1 semana después del trasplante. Las células positivas ( ← ) se encuentran dispersas por todo el trasplante. x125.

Figura 212. Linfocitos TcR  $\alpha\beta$ + (células R73+) ( → ) en un fragmento igual al mostrado en la Fig. 211. x125.





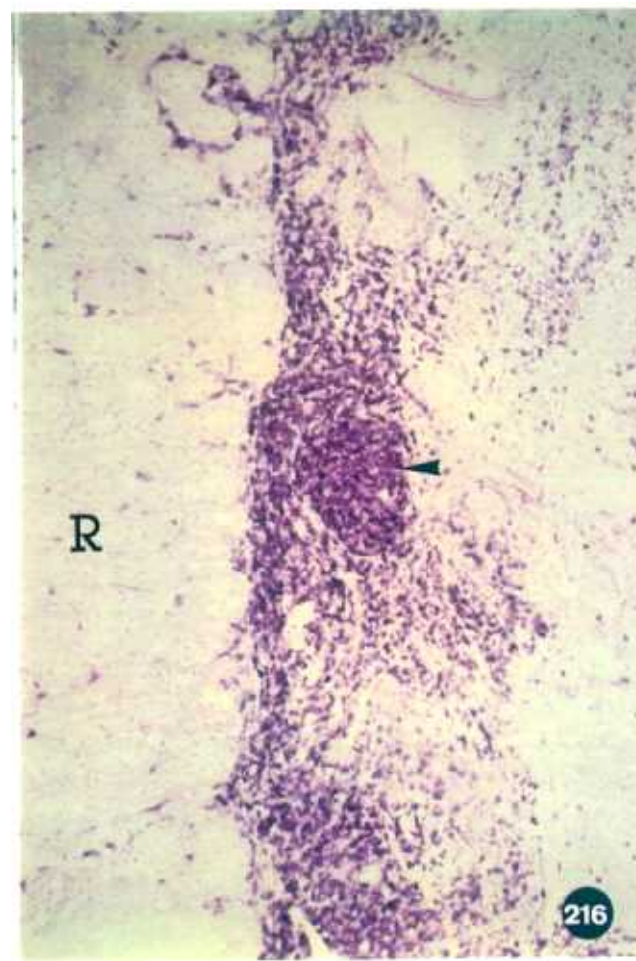
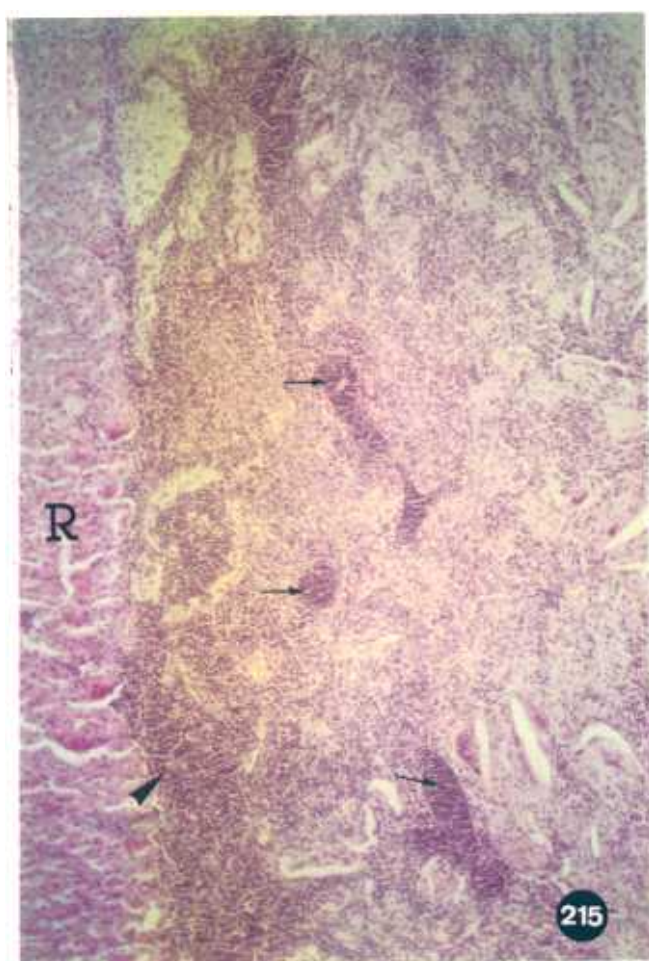
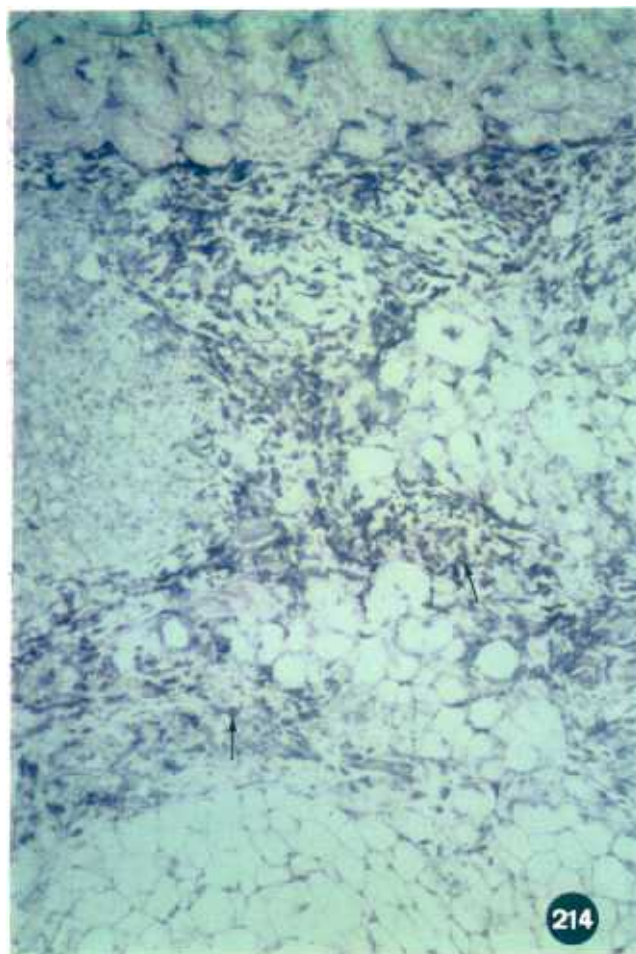
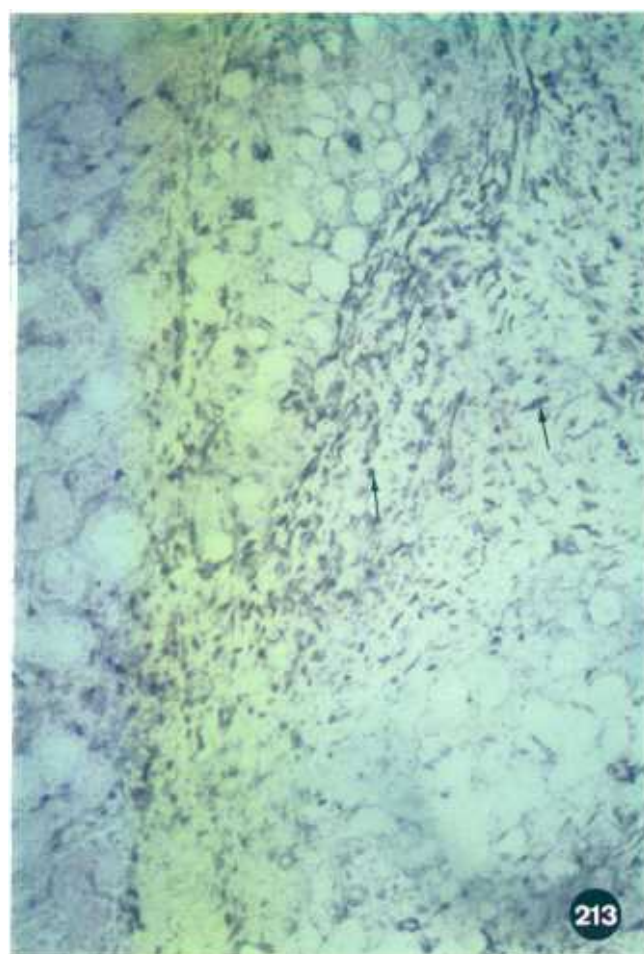
**Figura 213.** Células CD8+ (células OX-8+) ( ← ) en un fragmento igual al mostrado en la Fig. 211. x125.

**Figura 214.** Células CD4+ (células ER-2+) ( ← ) en un fragmento igual al mostrado en la Fig. 211. x125.

**Figura 215.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación singénica, 4 semanas después del trasplante. Se observa una masiva presencia de linfocitos por todo el trasplante, especialmente cerca del riñón ( ◄ ), y vasos ( ← ). R, túbulos renales. x100.

**Figura 216.** Células CD5+ (OX-19+) en el borde entre trasplante y riñón en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación singénica, 4 semanas después del trasplante. Obsérvense los grandes vasos llenos de linfocitos ( ◄ ) en zonas cercanas al tejido renal (R). x100.





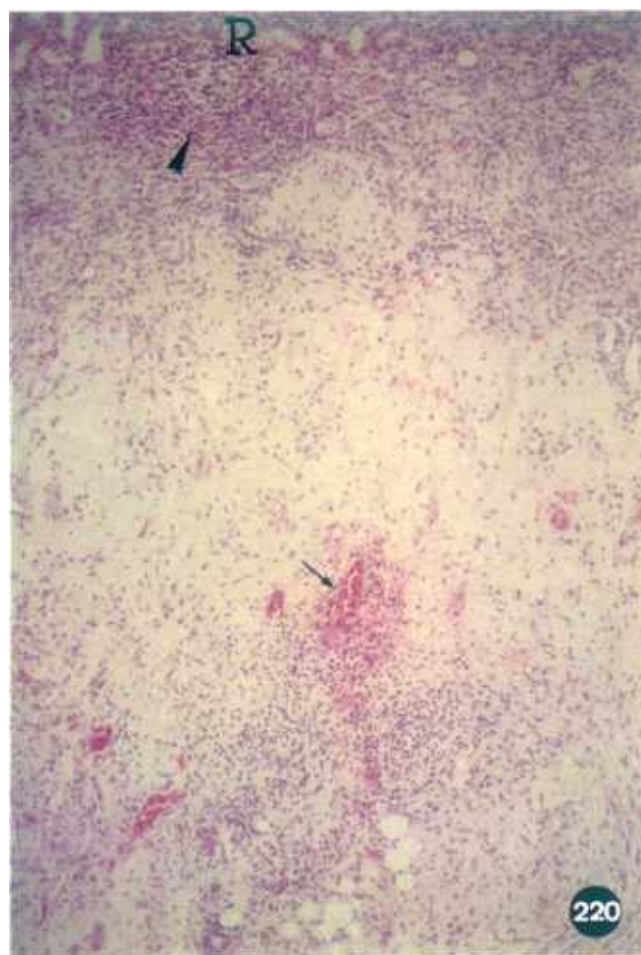
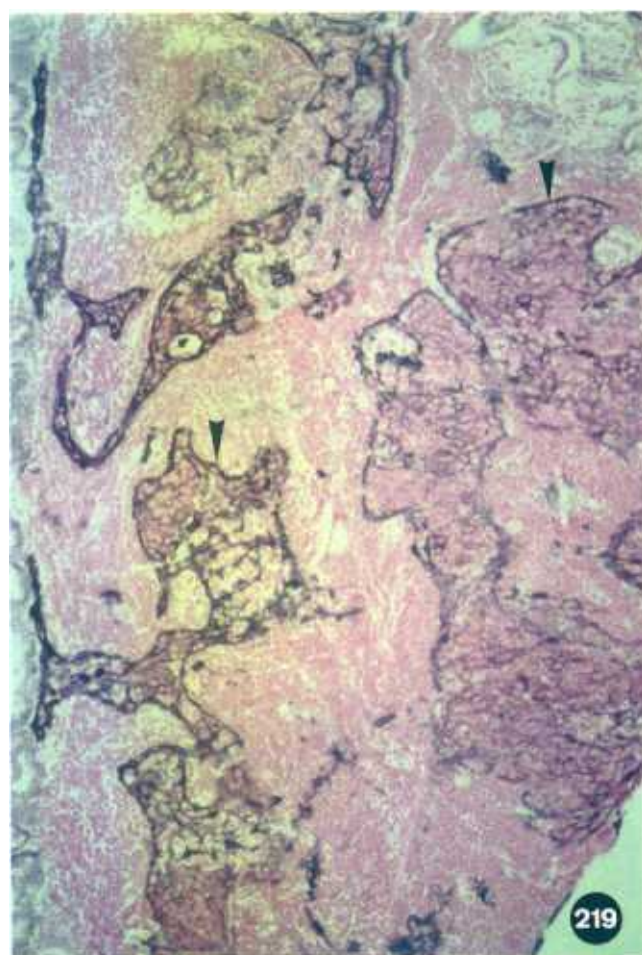
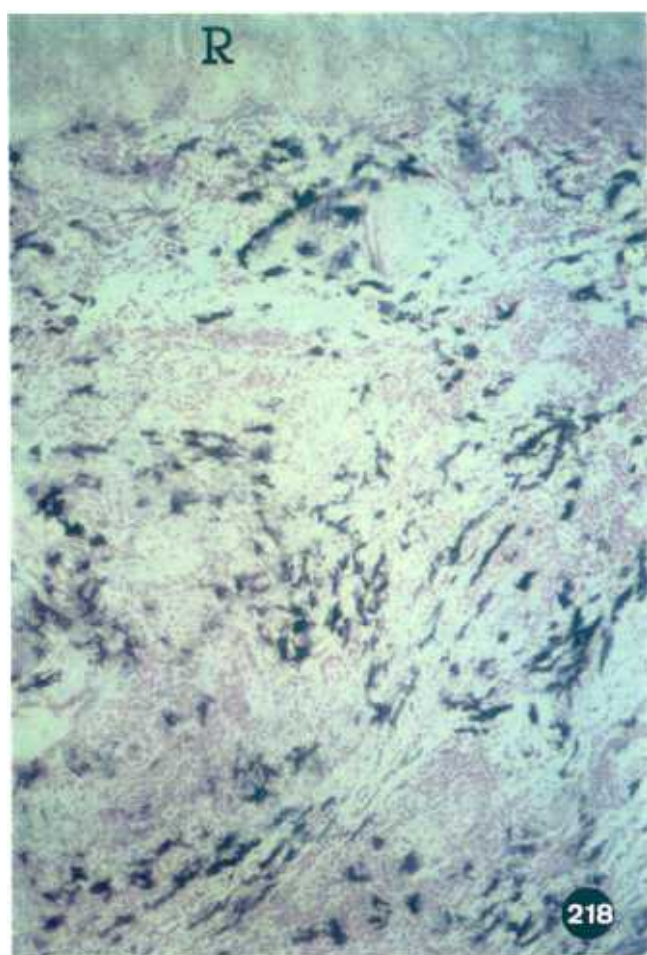
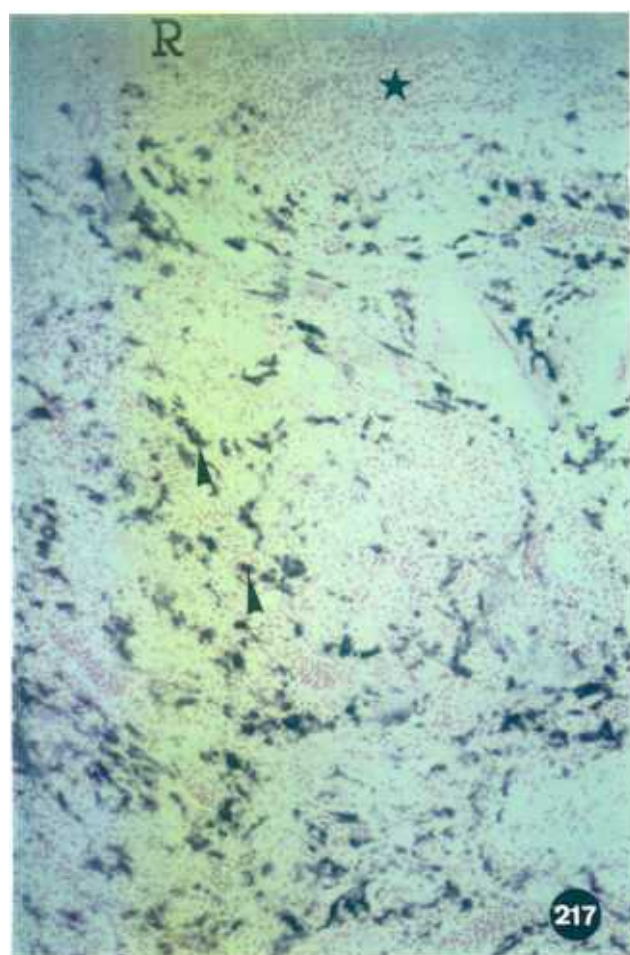


**Figura 217.** Macrófagos ED2+ en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación singénica, 1 semana después del trasplante. Las células positivas ( ► ) se distribuyen por todo el área del trasplante aunque el número es especialmente bajo en el borde entre trasplante y riñón ( ★ ). R, túbulo renal. x125.

**Figura 218.** Macrófagos ED2+ en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación singénica, 4 semanas después del trasplante. Los macrófagos no muestran apenas cambios en su distribución en el trasplante respecto a la situación una semana después del trasplante. R, túbulo renal. x125.

**Figura 219.** Células epiteliales citoqueratina+ ( ► ) en un fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml trasplantado bajo la cápsula renal en una rata eutímica, en combinación singénica, 4 semanas después del trasplante. Se observa un patrón reticular similar al observado en el caso de las ratas "nude" a las 4 semanas del trasplante. x125.

**Figura 220.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. El borde entre trasplante y riñón (R) está lleno de linfocitos ( ► ) y se observan zonas de células necróticas ( → ). x40.



**Figura 221.** Detalle de la Fig. 220 en el que se muestran numerosas células necróticas (►). x400.

**Figura 222.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. Al igual que lo descrito en los trasplantes realizados en similares condiciones con fragmentos cultivados adheridos a la superficie de cultivo, se observa una zona cercana al riñón (★) donde se acumulan numerosos linfocitos entre células no linfoides de citoplasma claro de aspecto epitelial (←). R, túbulos renales. x200.

**Figura 223.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. Detalle de la zona del fragmento más próxima al tejido renal, profundamente infiltrada por linfocitos (←). x200.

**Figura 224.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. Al igual que en el caso control (Fig. 169) el borde entre trasplante y riñón está formado por linfocitos (←) y células predominantemente epiteliales (◄). x200.



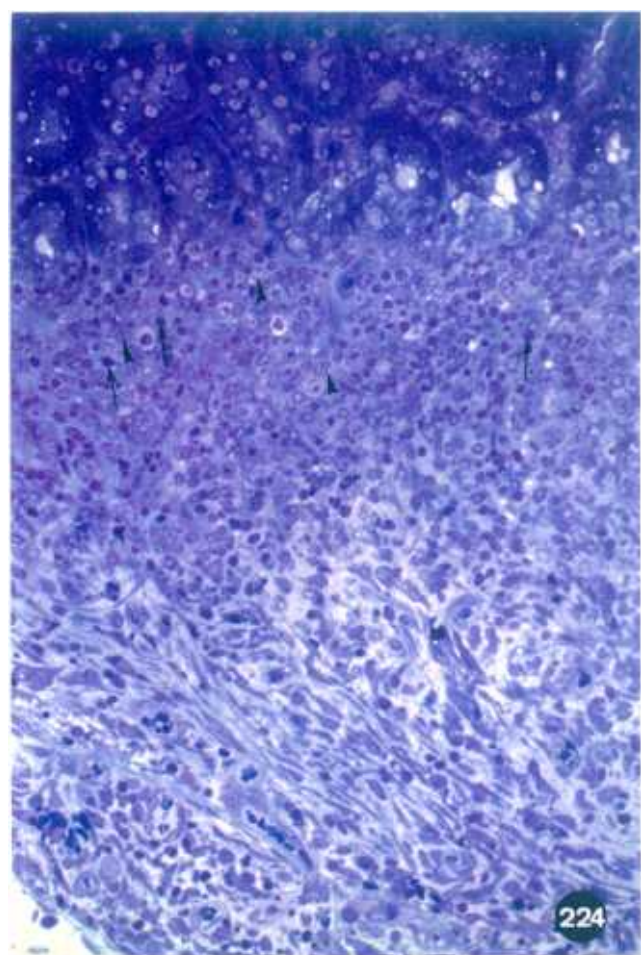
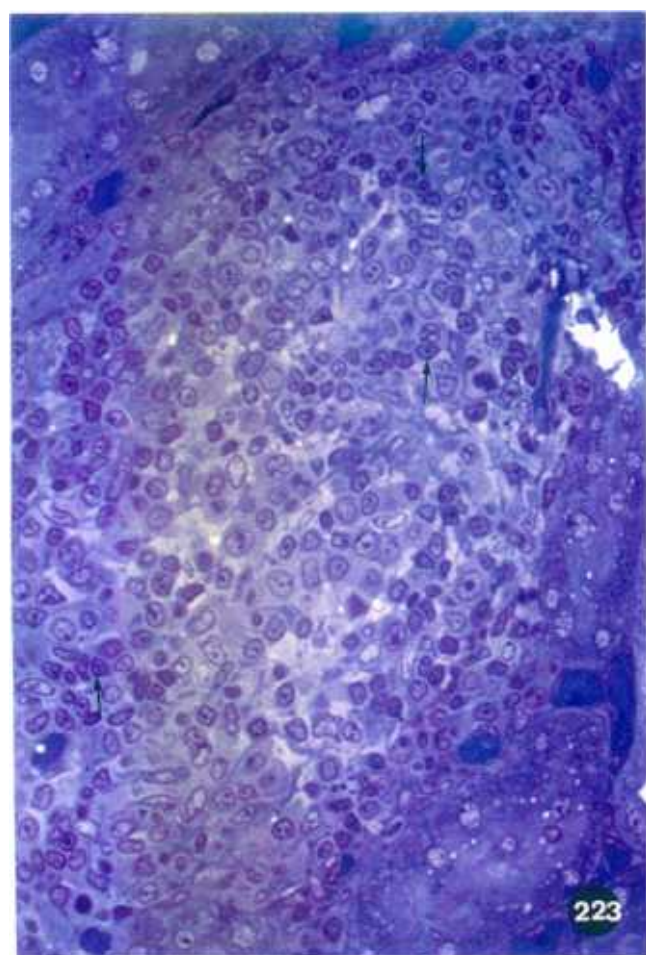
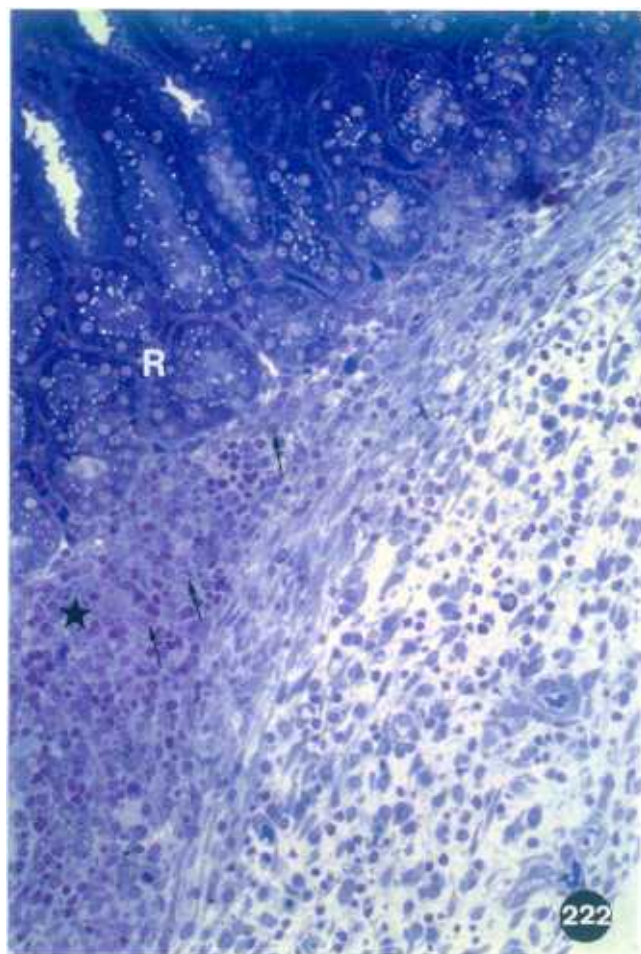
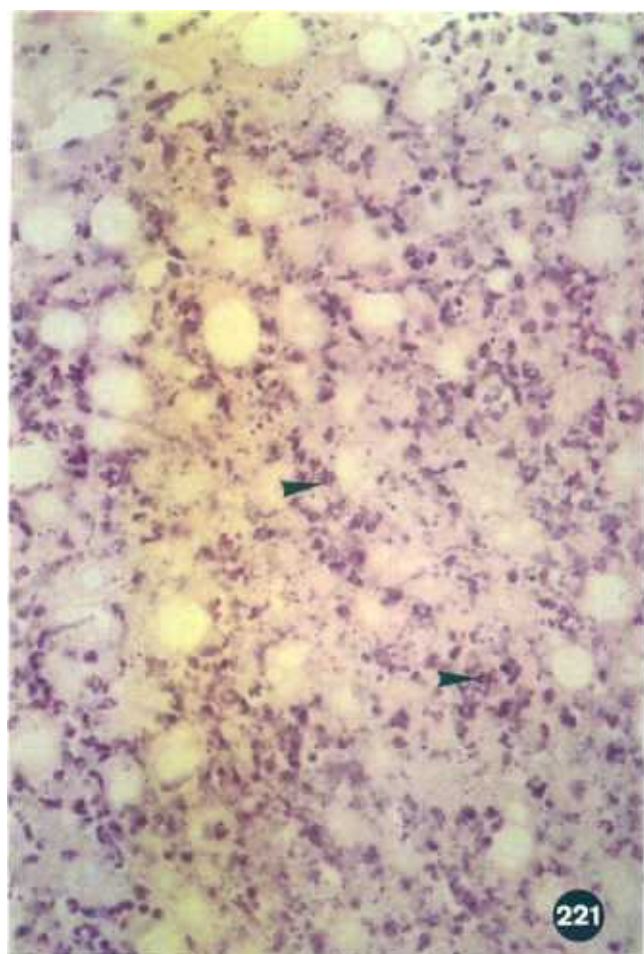


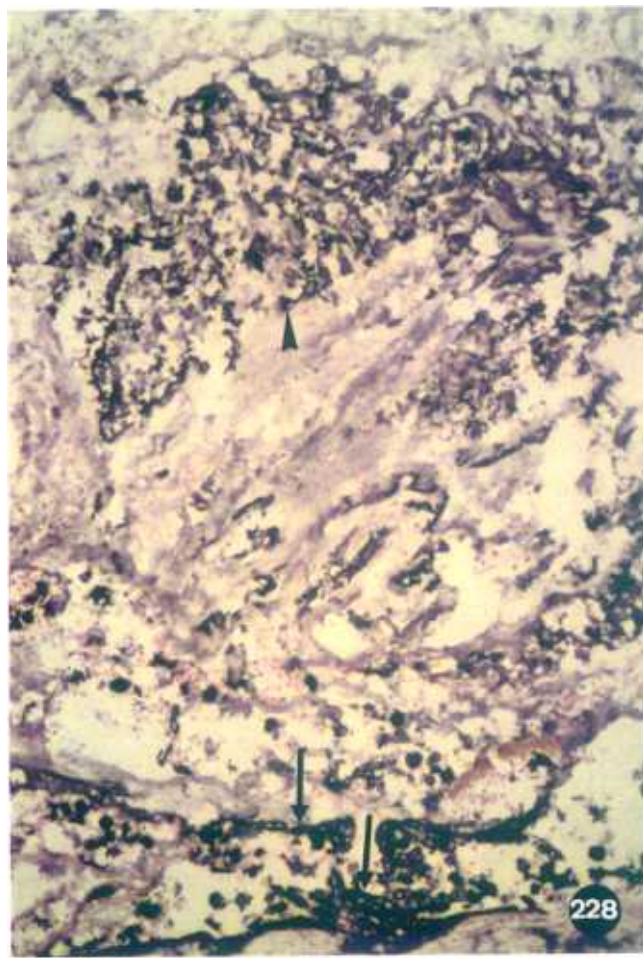
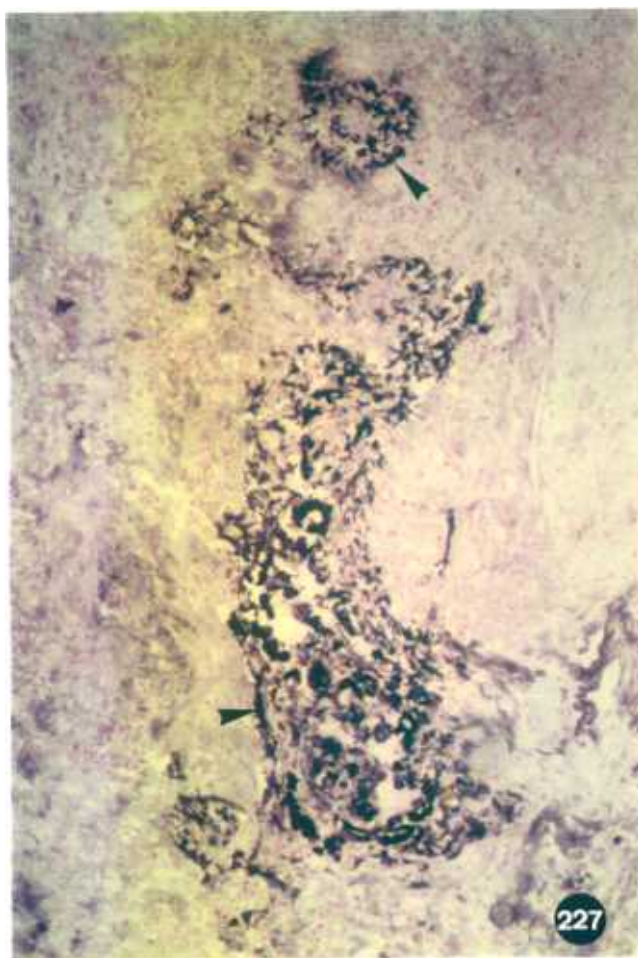
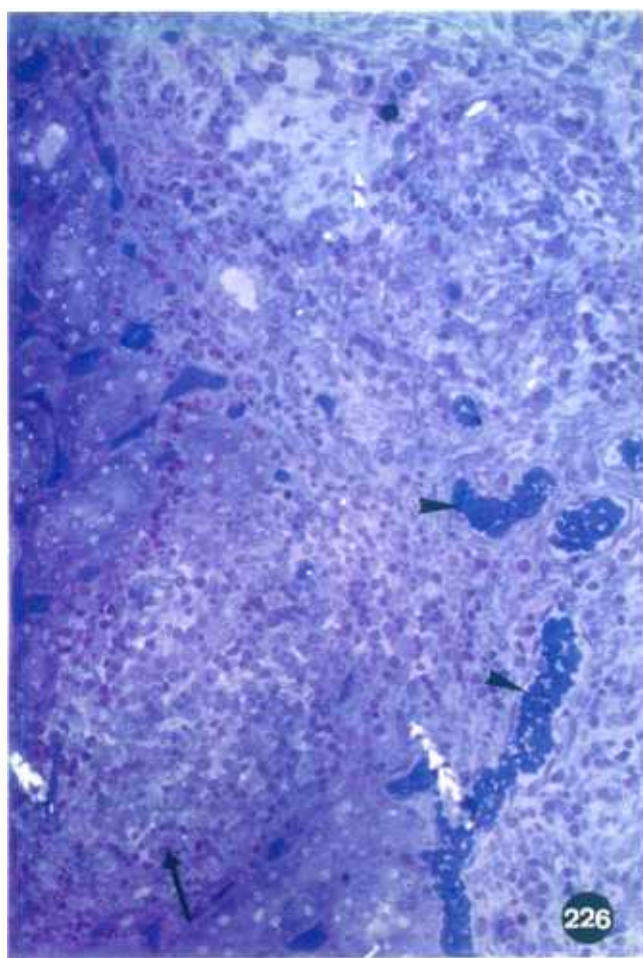
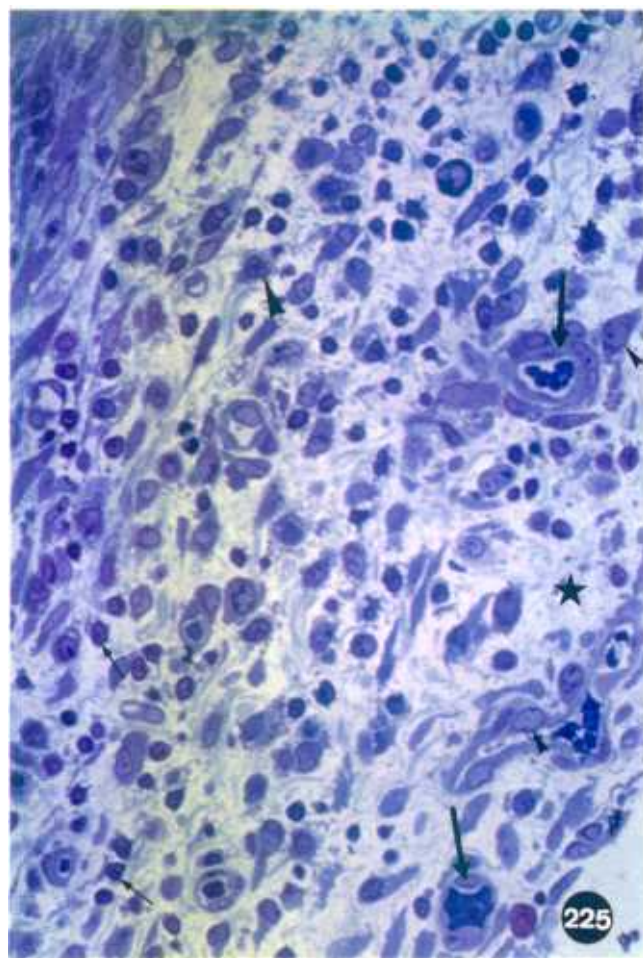
Figura 225. Detalle de la zona intermedia del fragmento mostrado en la Fig. 222 donde se observan numerosos linfocitos ( $\rightarrow$ ), células de aspecto monocítico ( $\blacktriangleleft$ ), células de aspecto epitelial ( $\blacktriangleright$ ) entre tejido conectivo ( $\star$ ) y vasos sanguíneos ( $\longrightarrow$ ). x400.

Figura 226. Fragmento cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. Se muestra el límite entre el tejido trasplantado y el tejido renal (R). Este límite no es continuo, como sucedía en las ratas "nude", y muchos de los linfocitos que infiltran el fragmento también se observan entre los túbulos renales ( $\longrightarrow$ ). Nótese la presencia de numerosos vasos sanguíneos de gran calibre ( $\blacktriangleright$ ). x200.

Figura 227. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, 1 semana después del trasplante. La mayoría de la tinción anti-citoqueratina está profundamente alterada ( $\blacktriangleright$ ). x125.

Figura 228. Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. Notar de nuevo la profunda alteración de la tinción con el anticuerpo anti-citoqueratina ( $\blacktriangleright$ ), si bien se pueden observar algunas bandas intactas en la parte más externa del trasplante ( $\longrightarrow$ ). x125.





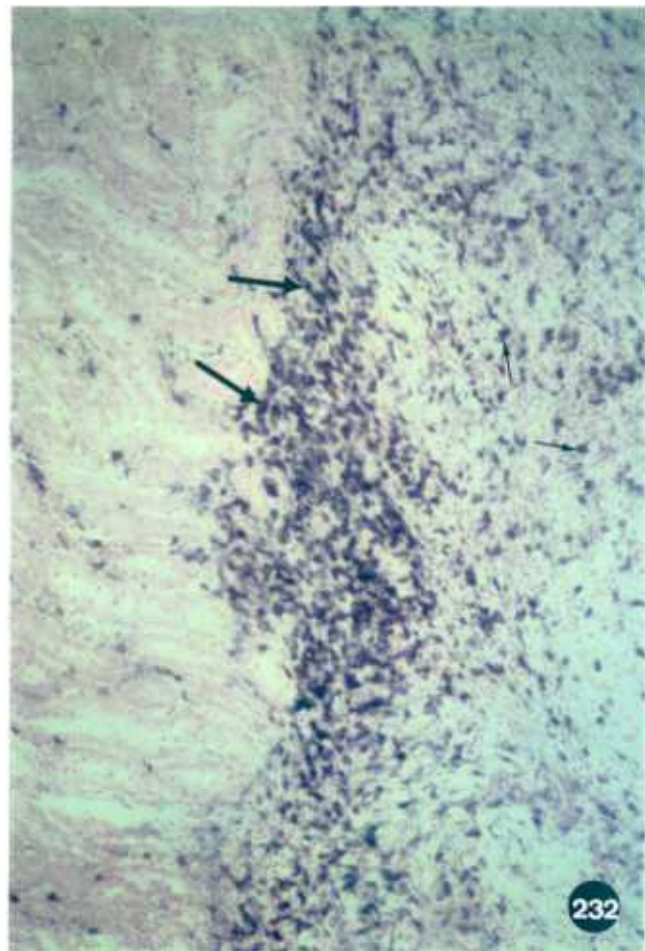
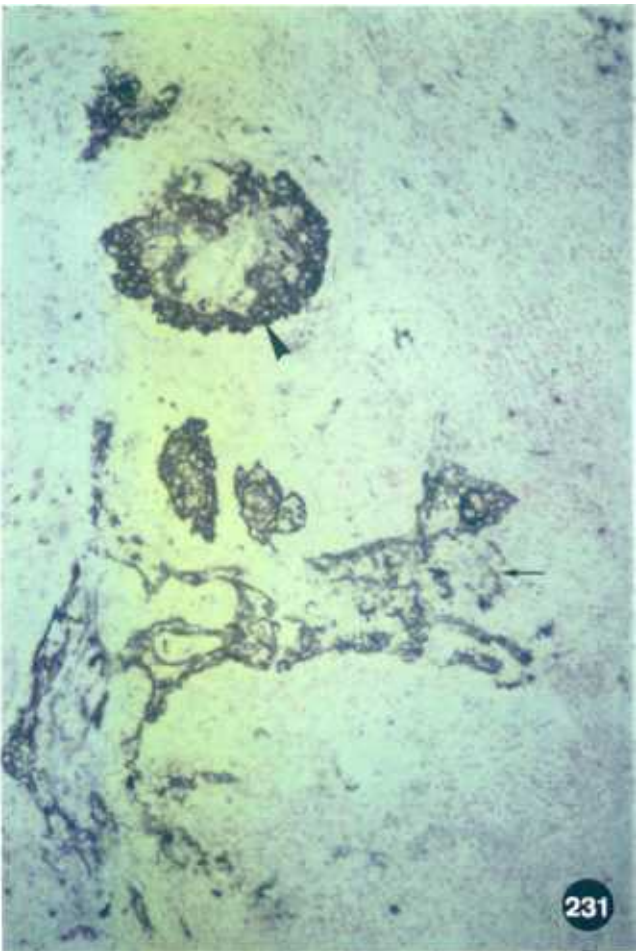
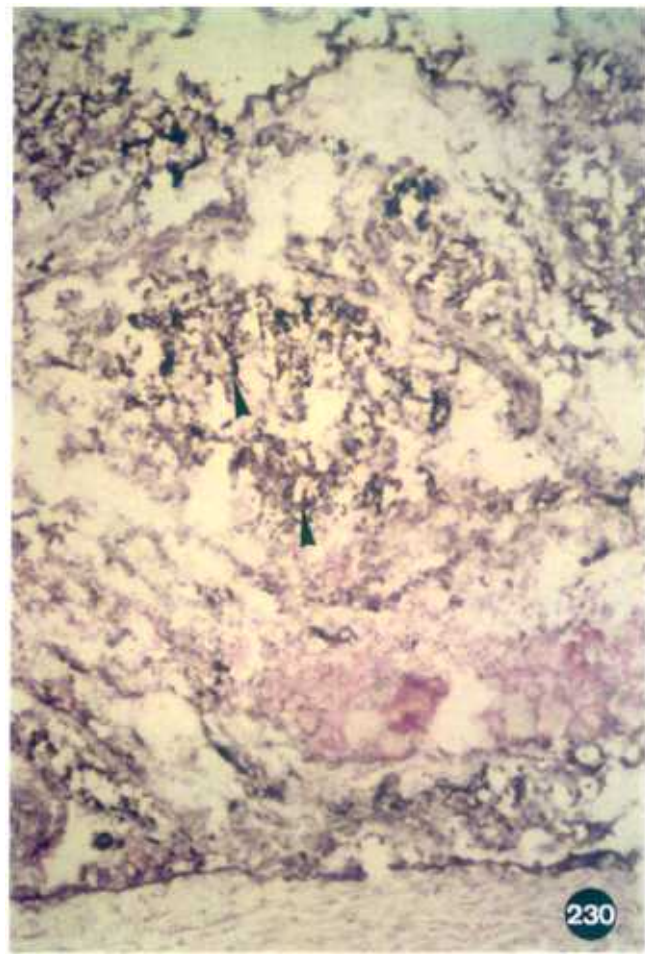
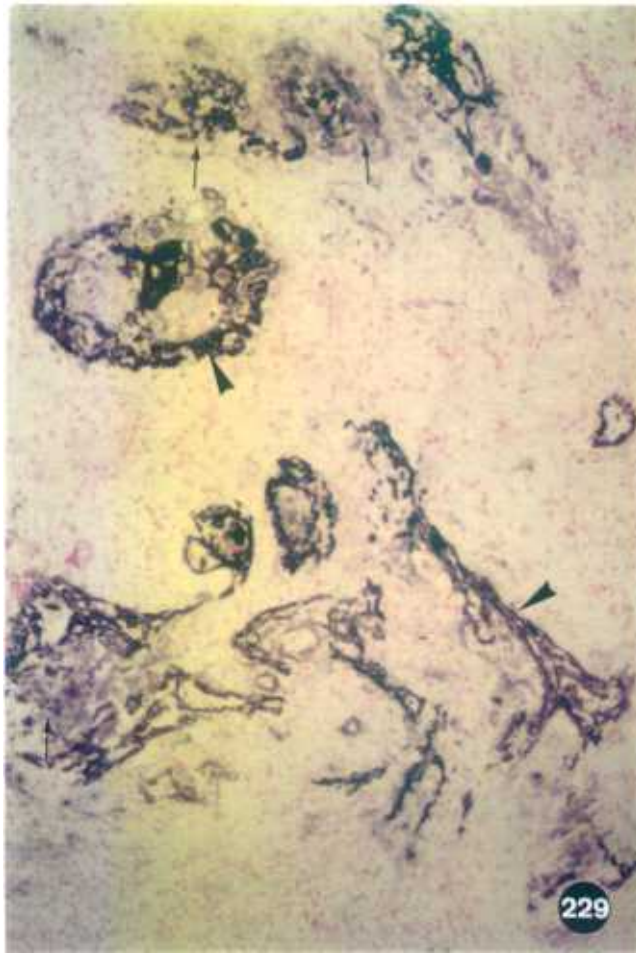
**Figura 229.** Células epiteliales citoqueratina+ ( ◄ ) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. Se muestran diversas áreas epiteliales, algunas con claros signos de degeneración ( ← ). x125.

**Figura 230.** Expresión de moléculas del MHC clase II del haplotipo donante (F17-23-2+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. Al igual que lo descrito para la expresión de citoqueratina (Figs. 227, 228, 229) la tinción está totalmente alterada ( ◄ ). x125.

**Figura 231.** Expresión de moléculas de MHC clase II del haplotipo donante (F17-23-2+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. En algunas regiones quedan células positivas aparentemente poco alteradas ( ◄ ), si bien en otras empiezan a tener signos de alteración ( ← ). x125.

**Figura 232.** Células CD5+ (OX-19+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. Las células positivas infiltran todo el tejido trasplantado ( ← ) y especialmente en el límite con el tejido renal ( → ). R, túbulo renal. x125.





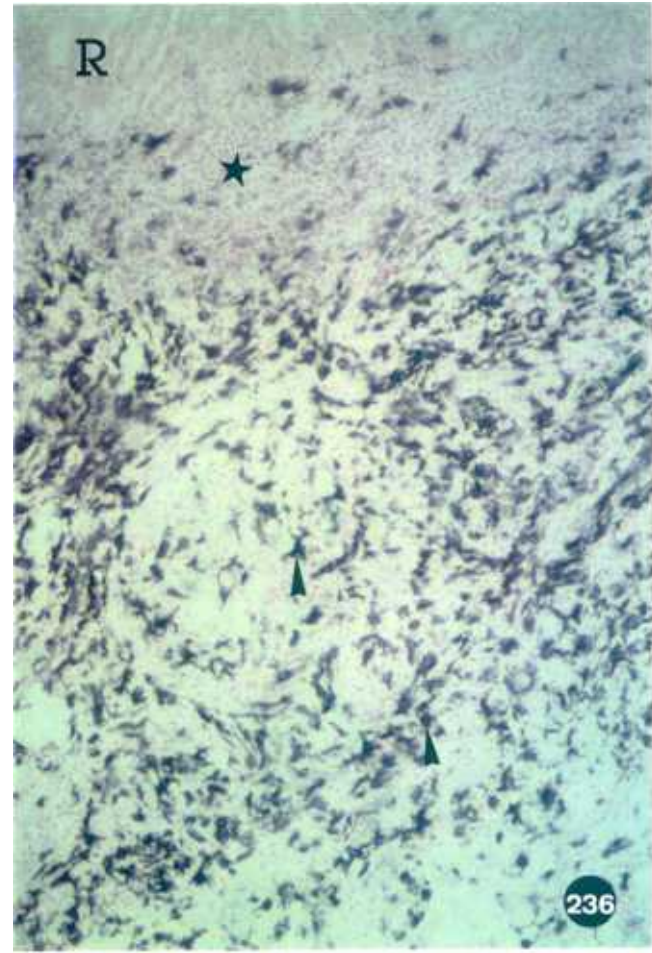
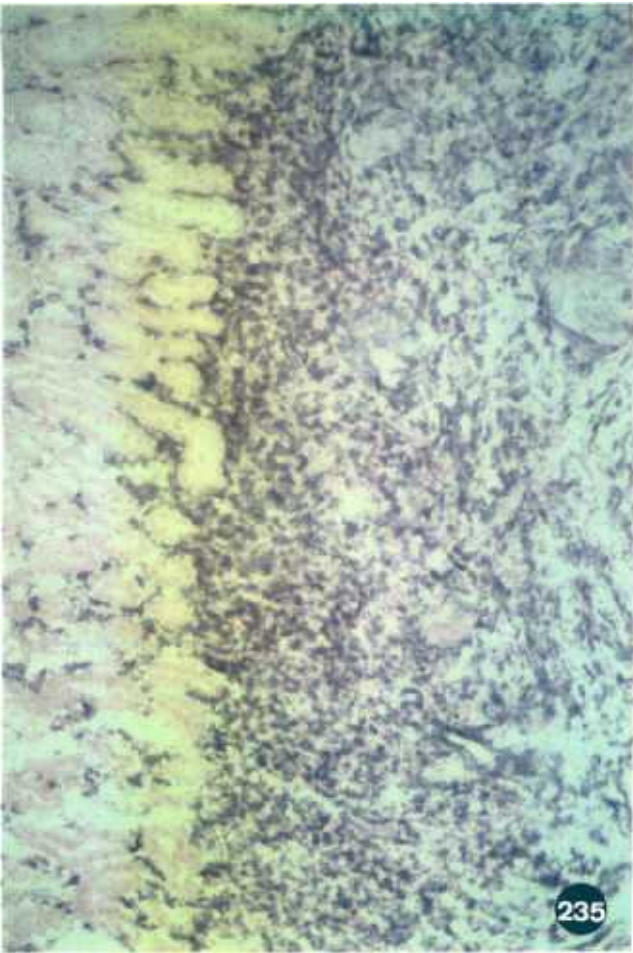
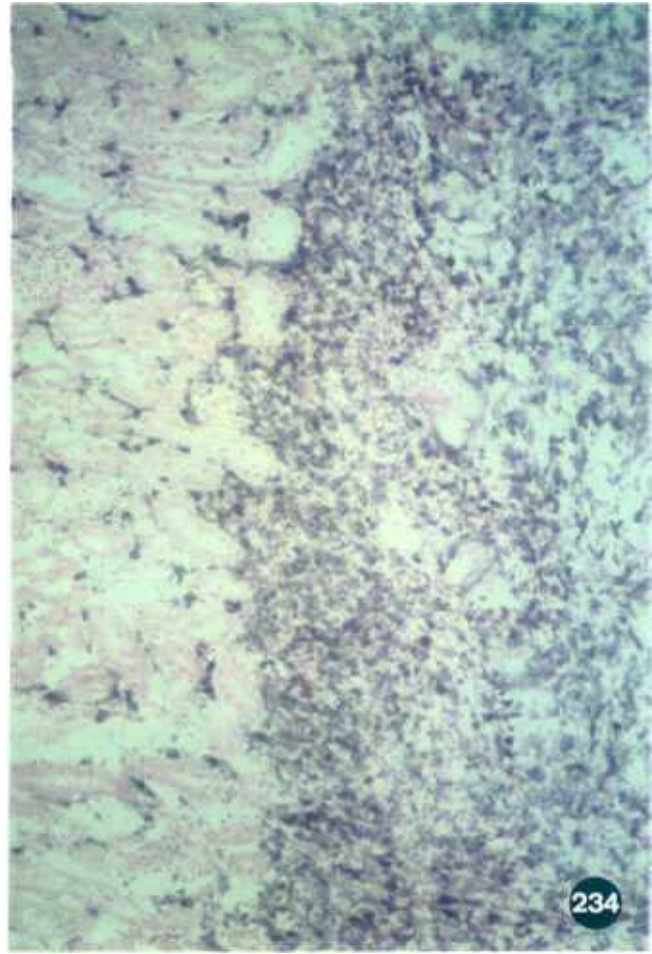
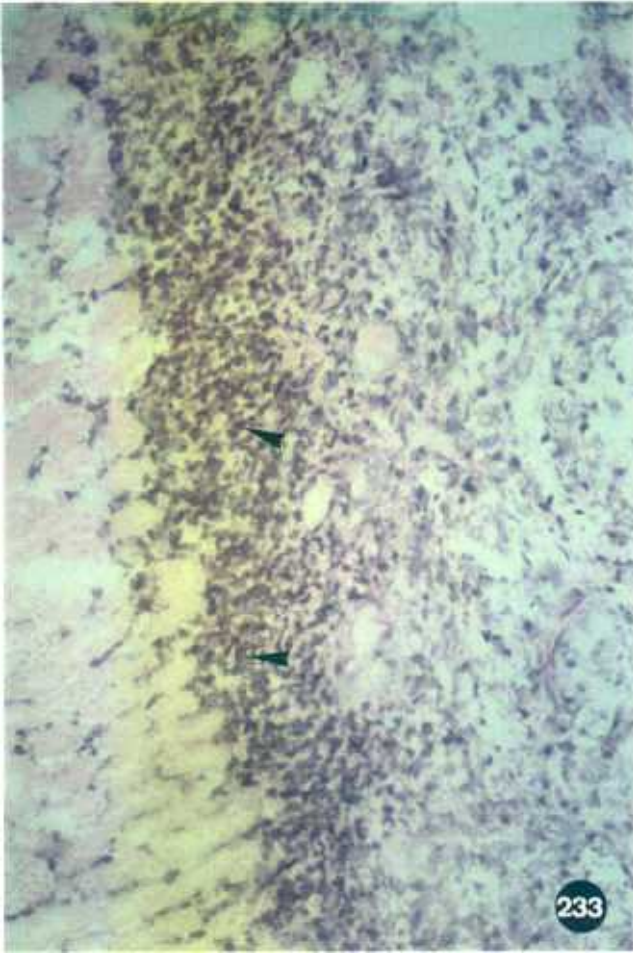
**Figura 233.** Linfocitos TcR  $\alpha\beta$ + (células R73+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. Como en el caso anterior, las células positivas para este marcador (  $\blacktriangleleft$  ) se concentran en el límite entre fragmento y tejido renal. x125.

**Figura 234.** Células CD8+ (OX-8+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. x125.

**Figura 235.** Células CD4+ (ER-2+) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. x125.

**Figura 236.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 1 semana después del trasplante. Se observan numerosos macrófagos ED2+ dispersos por todo el trasplante (  $\blacktriangleleft$  ), siendo su número muy bajo en el límite entre trasplante y riñón (  $\star$  ). R, túbulo renal. x125.





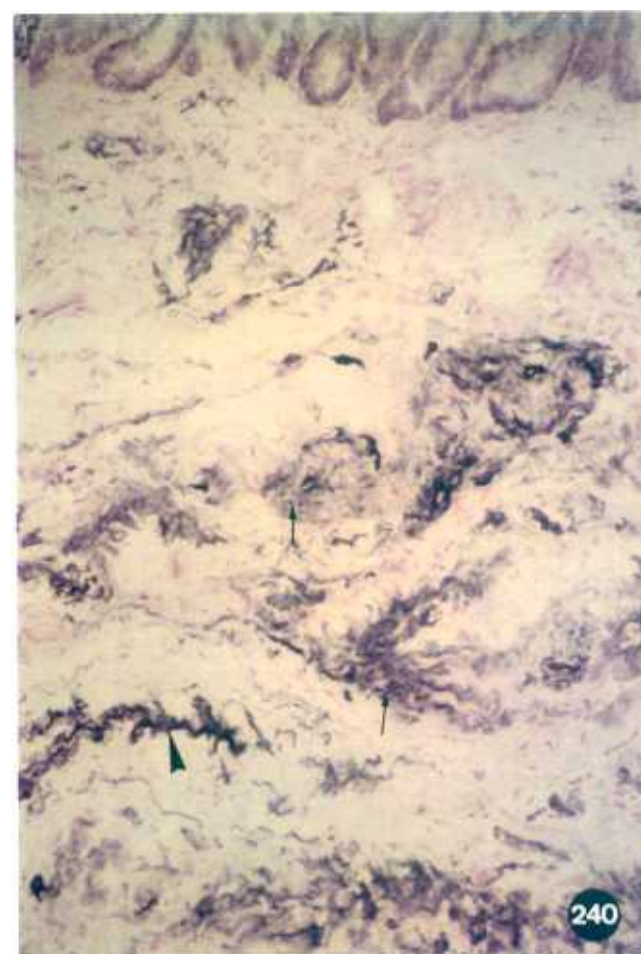
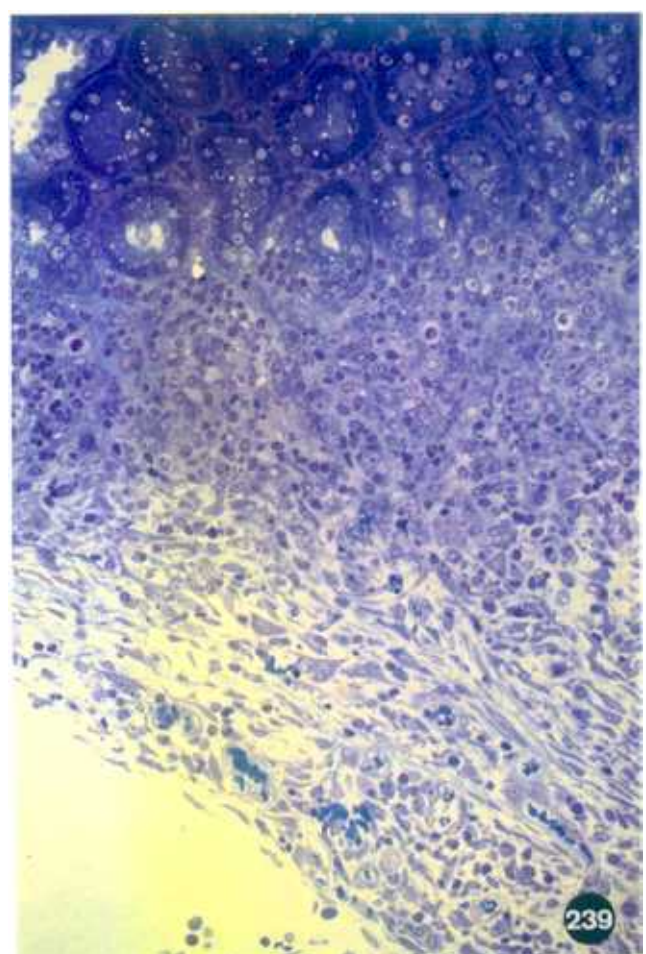
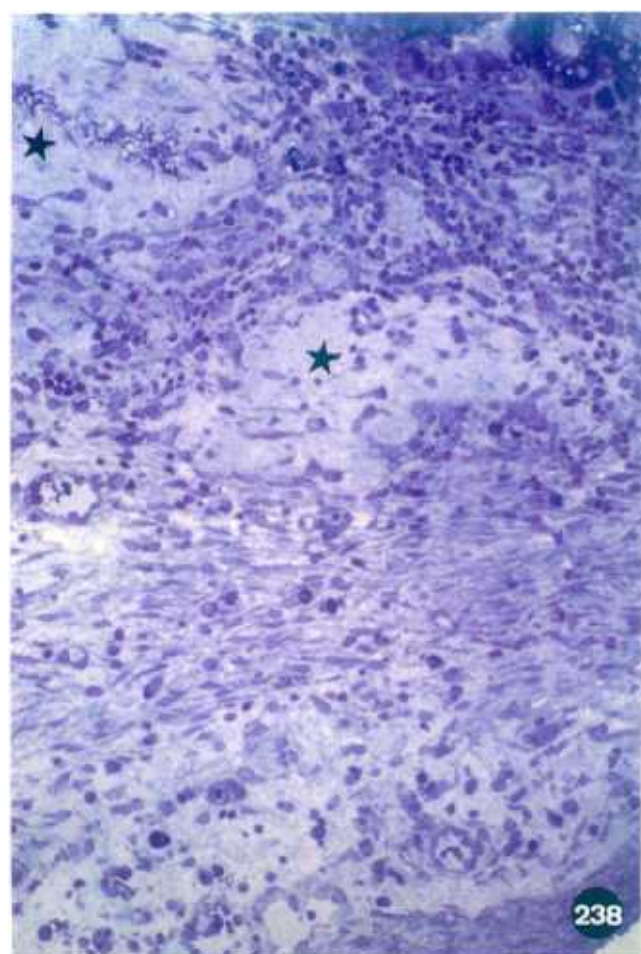
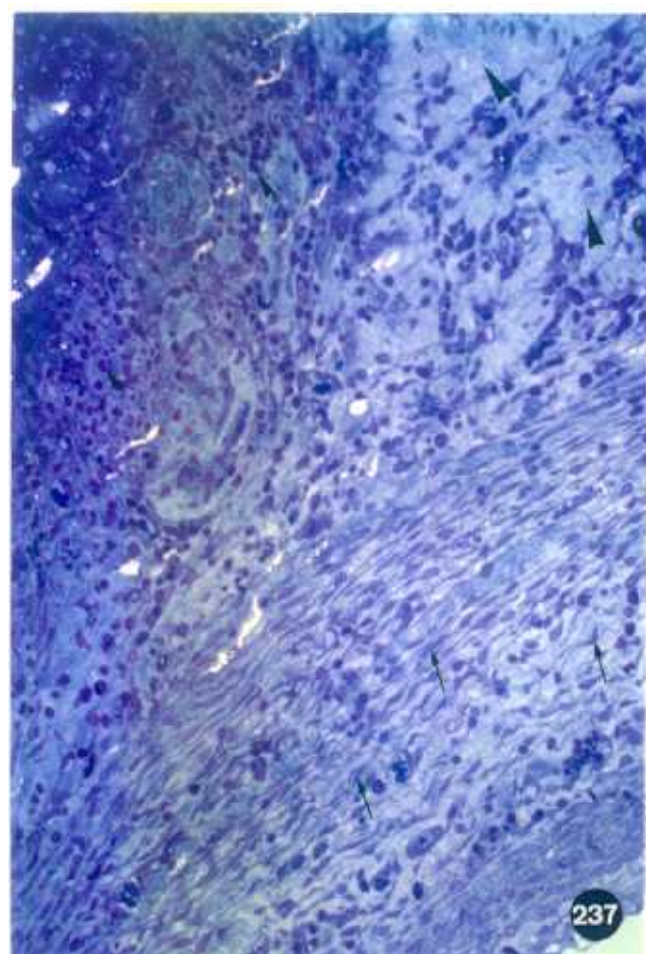


**Figura 237.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Notar el importante aumento de tejido conectivo (◄) y células de aspecto fibroblástico (←), aunque todavía quedan infiltrados linfoides (◄) próximos a los túbulos renales. x200.

**Figura 238.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Se sigue apreciando un infiltrado linfoide en el límite entre el fragmento y el tejido renal, pero la cantidad de tejido conectivo (★) ha crecido considerablemente. x200.

**Figura 239.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con CsA 3,0µg/ml trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. x200.

**Figura 240.** Células epiteliales citoqueratina+ (◄) en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. La tinción apenas es reconocible en los restos de las bandas epiteliales (←). x200.



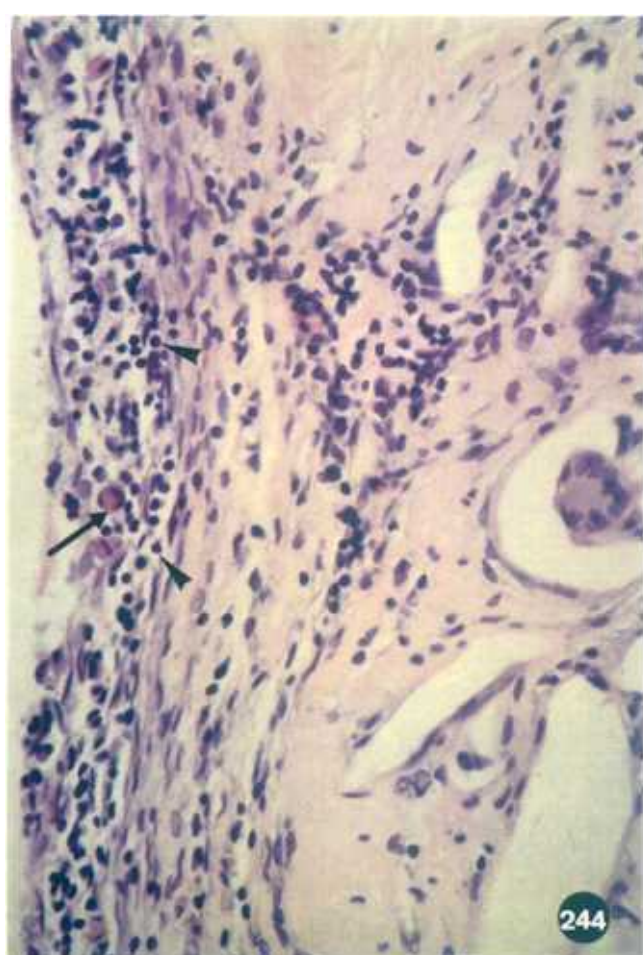
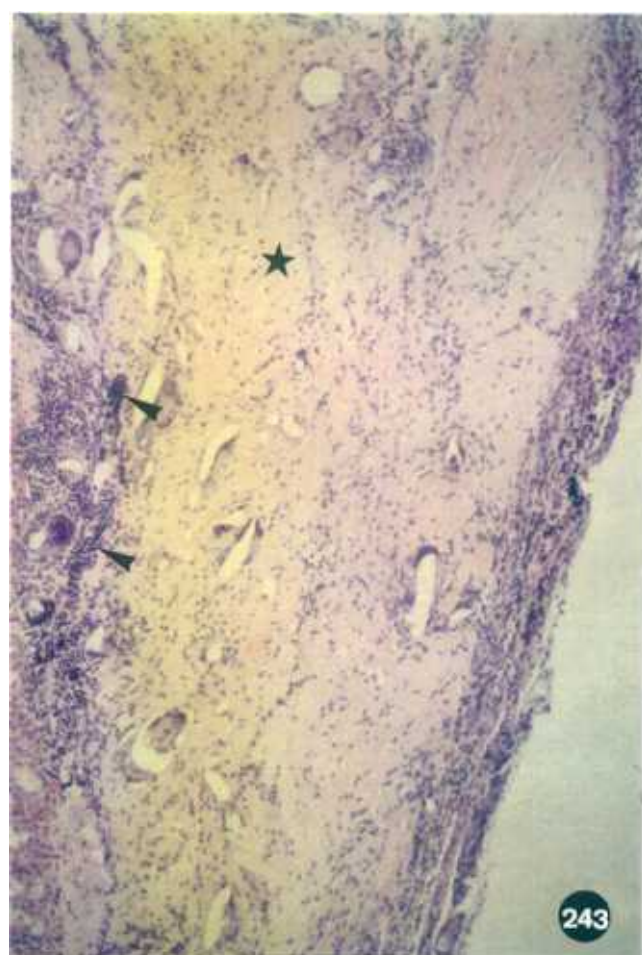
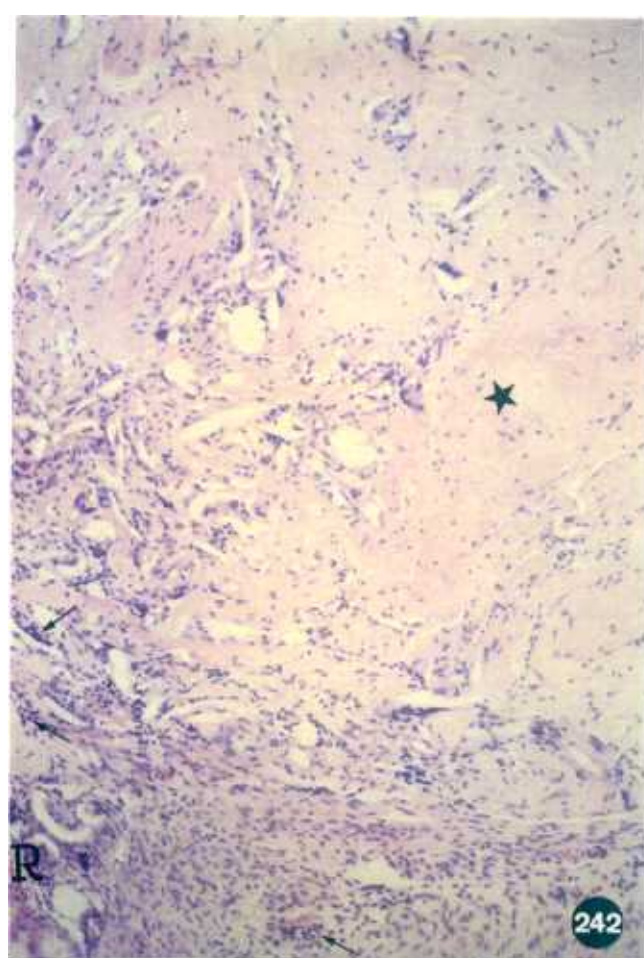
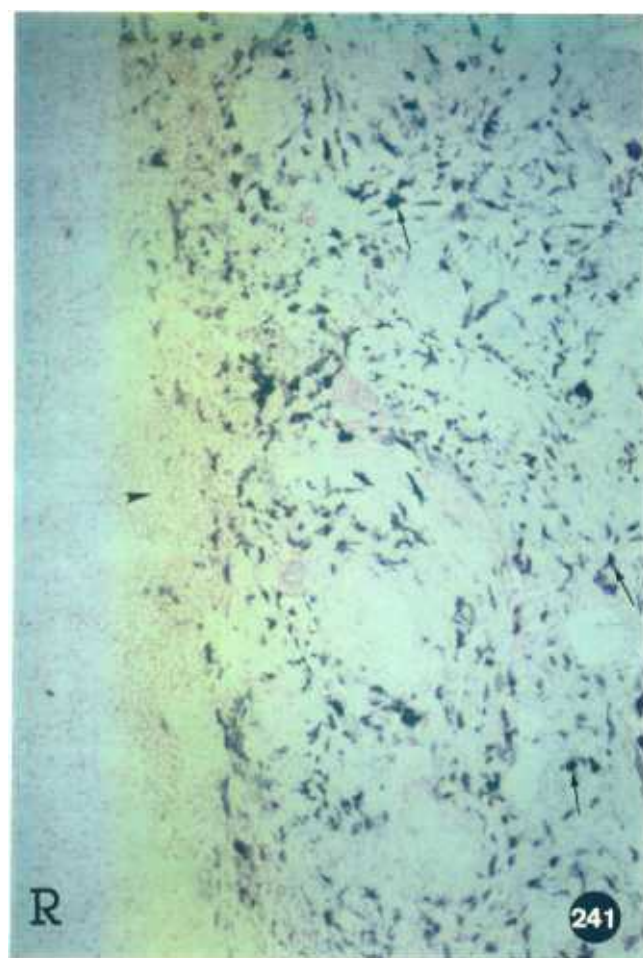
**Figura 241.** Macrófagos ED2+ en un fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 2 semanas después del trasplante. Los macrófagos se encuentran dispersos por toda el área del trasplante (←) y, en bajo número (➤), en el borde entre riñón (R) y fragmento trasplantado. x125.

**Figura 242.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días en medio control trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 3 semanas después del trasplante. El trasplante ha quedado reducido a una matriz de colágeno (★) y apenas se observan linfocitos. Cuando éstos están presentes, se distinguen en áreas cercanas al tejido renal (←). R, túbulos renales. x100.

**Figura 243.** Fragmento de timo cultivado en suspensión durante 8 días tratado con dGuo 1,35mM trasplantado bajo la cápsula renal de una rata eutímica, en combinación alogénica, 3 semanas después del trasplante. Como en la Fig. 242 el fragmento el tejido es una masa homogénea de colágeno (★), más o menos infiltrada por linfocitos (◄), sin restos de epitelio. x400.

**Figura 244.** Detalle de la Fig. 243 donde se observa el infiltrado de células linfoides (◄) y algunos eosinófilos (→). x400.





**Figura 245.** Fragmento de timo en cultivo organotípico, cultivado en medio control durante 5 días. Obsérvese que la mayoría del fragmento está ocupado por una matriz de colágena (★) sin apenas linfocitos, entre la que se observan macrófagos (◄) y algunas células epiteliales (→). x400.

**Figura 246.** Fragmento de timo en cultivo organotípico, cultivado con 1,35mM de dGuo durante 5 días. Se puede apreciar la presencia de numerosos linfocitos picnóticos (◄), macrófagos y zonas, rodeando el fragmento, de células epiteliales (→). x200.

**Figura 247.** Fragmento de timo en cultivo organotípico, cultivado con 1,35mM de dGuo durante 5 días. Detalle del mismo fragmento mostrado en la Fig. 246 en el que se observan algunas células linfoides vivas en el interior del fragmento (◄). x400.



